

**Beiträge zur Kenntnis der Pheromone**  
**Chemische Untersuchung**  
**des Spurpheromons der Termiten**  
***Zootermopsis nevadensis* Hagen**  
**und**  
**Orientierende Versuche**  
**am Voraugendrüsensekret einiger Gazellen**

**INAUGURAL-DISSERTATION**  
**zur**  
**Erlangung der Doktorwürde**  
**der**  
**Naturwissenschaftlichen Fakultät**  
**der Philipps-Universität Marburg/Lahn**

**Vorgelegt von**  
**Hans Hummel**  
**Heilbronn**

**Marburg/Lahn 1968**



**Beiträge zur Kenntnis der Pheromone**  
**Chemische Untersuchung**  
**des Spurpheromons der Termiten**  
***Zootermopsis nevadensis* Hagen**  
**und**  
**Orientierende Versuche**  
**am Voraugendrüsensekret einiger Gazellen**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

**zur**

**Erlangung der Doktorwürde**

**der**

**Naturwissenschaftlichen Fakultät**

**der Philipps-Universität Marburg/Lahn**

**Vorgelegt von**  
**Hans Hummel**  
**Heilbronn**

**Marburg/Lahn 1968**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Philipps-Universität Marburg/Lahn als

Dissertation angenommen am 18. 4. 1968

Tag der mündlichen Prüfung am 18. 5. 1968

Berichterstatter : Prof. Dr. P. Karlson

Mitberichterstatter : Prof. Dr. H. U. Koecke

Gedruckt mit Unterstützung des Marburger  
Universitätsbundes e. V.



Für  
ISOLDE



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41554411\\_0110](https://archive.org/details/IA41554411_0110)

# INHALTSVERZEICHNIS

---

Seite

## TEIL I

### Verzeichnis der Abkürzungen

|       |                                                                               |       |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 1.1   | <u>Einleitung</u>                                                             | 1     |
| 1.2   | Problemstellung                                                               | 2     |
| 2.    | <u>ALLGEMEINER TEIL</u>                                                       | 7     |
| 2.1   | Der biologische Test                                                          | 7     |
| 2.2   | Materialgewinnung und Vorversuche                                             | 12    |
| 2.2.1 | Materialgewinnung                                                             | 12    |
| 2.2.2 | Chemische und physikalisch-chemische Vorversuche                              | 13    |
| 2.3   | Näherungsberechnung der Spurstoffeinheit und der zu erwartenden Pheromonmenge | 22    |
| 2.4   | Planung der Aufarbeitungsschritte                                             | 23    |
| 3.    | <u>ERGEBNISSE</u>                                                             | 25-78 |
| 3.1   | Anreicherung des Spurpheromons aus Termiten-gesamtextrakten                   | 25    |
| 3.2   | Die Aufarbeitungsschritte im Einzelnen                                        | 27    |
| 3.2.1 | Wasserdampfdestillation                                                       | 27    |
| 3.2.2 | n-Pentanextraktion                                                            | 29    |
| 3.2.3 | Eindampfen der n-Pentanlösung                                                 | 30    |
| 3.3   | Erreichte Anreicherung und Ausbeuten                                          | 34    |
| 3.4   | Versuche zur Identifizierung einiger Fremd-stoffe                             | 35    |
| 3.4.1 | Dünnschichtchromatographie                                                    | 35    |
| 3.4.2 | Gaschromatographische Versuche                                                | 36    |
| 3.4.3 | UV-Versuche                                                                   | 42    |
| 3.4.4 | IR- Versuche                                                                  | 43    |
| 3.4.5 | Das Retentionsindexsystem                                                     | 45    |
| 3.5   | Weitere Aufarbeitung                                                          | 52    |
| 3.5.1 | Hochvakuumdestillation im Kugelrohr                                           | 52    |
| 3.5.2 | Versuche zur Identifizierung der destil-lierten Inhaltsstoffe                 | 54    |
| 3.5.3 | Chemische Versuche                                                            | 57    |
| 3.5.4 | Gaschromatographische Untersuchungen der HV-Destillate                        | 57    |
| 3.5.5 | Harnstoff-Trennung                                                            | 60    |
| 3.5.6 | Anreicherungsfaktoren in den Aufarbei-tungsschritten 5 und 6                  | 61    |
| 3.5.7 | Auffangversuch und biologische Aus-wertung                                    | 61    |

|                                                                                         | Seite |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 3.6 Massenspektrometrische Versuche zur<br>Identifizierung einiger Pheromonbestandteile | 62    |
| 3.7 Versuche mit dem gekoppelten GLC-MS-<br>System                                      | 64    |
| 3.8 Vergleichende Untersuchung biologisch aktiver<br>Substanzen                         | 74    |
| 3.8.1 Tabellen                                                                          | 73    |
| 3.8.2 Diskussion der vergleichenden biologi-<br>schen Tests                             | 74    |
| 4. <u>DISKUSSION DER ERGEBNISSE</u>                                                     | 79    |

## TEIL II

|                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5. <u>ORIENTIERENDE VERSUCHE AM VORAUGEN-<br/>DRÜSENSEKRET EINIGER GAZELLEN</u> | 82 |
| 5.1 Chemische Versuche                                                          | 83 |
| 5.2 Biologische Versuche                                                        | 86 |
| 6. <u>DISKUSSION DER ERGEBNISSE</u>                                             | 94 |

## TEIL III

|                                                         |        |
|---------------------------------------------------------|--------|
| 7. <u>BESCHREIBUNG DER VERSUCHE</u>                     | 95-110 |
| 7.1 Biologische Versuche                                | 95     |
| 7.2 Chromatographische und spektrometrische<br>Versuche | 101    |
| 7.3 Chemische Versuche                                  | 106    |
| 8. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>                               | 111    |
| 9. <u>SCHRIFTENVERZEICHNIS</u>                          | 113    |
| LEBENS LAUF                                             |        |

## Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten

### Abkürzungs-Symbole

|        |                                                            |
|--------|------------------------------------------------------------|
| GLC    | Gaschromatographie, Gaschromatogramm                       |
| MS     | Massenspektrometrie, Massenspektrum                        |
| M      | Molekulargewicht                                           |
| m/e    | auf die Elementarladungseinheit reduzierte<br>Molekülmasse |
| IR     | Infrarotspektroskopie, Infrarotspektrum                    |
| UV     | Ultravioletspektroskopie, Ultravioletspektrum              |
| DC     | Dünnschichtchromatographie, Dünnschichtchromatogramm       |
| FID    | Flammenionisationsdetektor                                 |
| ECD    | Elektroneneinfangdetektor                                  |
| SE     | Spureinheit des biologischen Verhaltenstests               |
| KW     | Kohlenwasserstoff                                          |
| $\phi$ | Durchmesser                                                |



## TEIL I

### 1.1 EINLEITUNG

Artspezifische Lockdüfte von Schmetterlingen hatten schon sehr früh die Phantasie der Naturforscher erregt. Konnte sich noch 1906 FABRE <sup>1)</sup> nicht klar entscheiden, ob er chemische Stoffe oder physikalische Fernwirkungen für die Lockwirkung verantwortlich machen sollte, so wissen wir heute zweifelsfrei, daß es Moleküle sind, die beim Auftreffen auf die Sinneszellen der Antennen die Lockwirkung auslösen. Den endgültigen Beweis dafür haben BUTENANDT und Mitarbeiter <sup>2)</sup> 1959 mit der Reindarstellung und Strukturaufklärung des Bombykols, des Sexuallockstoffs des weiblichen Seidenspinners, erbracht. Die weitere Entwicklung seit 1959 erweiterte die Kenntnis von der chemischen Konstitution solcher Wirkstoffe des Tierreiches um ein Vielfaches <sup>3, 4)</sup>.

Diese Stoffe sind unter dem Namen "Pheromone" bekannt geworden. KARLSON <sup>5, 6, 7)</sup>, LÜSCHER und BUTENANDT <sup>8)</sup> fassen unter diesem Begriff eine Klasse biologisch aktiver Naturstoffe zusammen, die definiert sind als Stoffe oder Stoffgemische, die von einem Individuum nach außen abgegeben werden und auf ein zweites Individuum derselben Art einwirken. Dabei lösen sie eine oder mehrere spezifische Reaktionen aus, z. B. eine definierte Verhaltensweise und/oder eine entwicklungsphysiologische Determination. Entscheidend ist das Prinzip der Wirksamkeit minimaler Substanzmengen. Den Pheromonen, Botenstoffen zwischen Individuen, kommt so ein Platz als Stoffklasse neben den Hormonen, Gamonen und Termonen zu.

Gegen diese Definition wurden im Schrifttum einige formale<sup>9, 10)</sup> und prinzipielle<sup>11-14)</sup> Einwände laut. Die überwiegende Mehrzahl der Fachkollegen jedoch schloß sich diesem Nomenklaturvorschlag an. Er hat sich im angelsächsischen Schrifttum<sup>15)</sup> voll durchgesetzt und dazu beigetragen, den von BETHE<sup>16)</sup> 1932 geprägten, in sich widerspruchsvollen Ausdruck "Ectohormone" zu ersetzen. Beim 2. Internationalen Kongress für Endokrinologie (London 1964) fand ein eigenes Symposium über "Pheromone"<sup>17)</sup> statt, ein Hinweis auf das wachsende wissenschaftliche Interesse an dieser Stoffklasse. Viele Insekten sind als Versuchstiere leicht zugänglich und im Laboratorium in großen Mengen zu halten und zu züchten. Untersuchungen über die Pheromone der Insekten überwiegen daher die Zahl der Wirbeltierpheromone bis heute bei Weitem. Zunächst waren es mehr oder weniger angereicherte Extrakte, die für Verhaltensstudien, für biochemische und elektrophysiologische Untersuchungen<sup>18)</sup> sowie für praktische Anwendungen in der Schädlingsbekämpfung<sup>19, 20)</sup> verwendet wurden. Später eröffnete die Konstitutionsaufklärung den Weg zur chemischen Synthese<sup>21, 22)</sup> größerer Mengen der reinen Stoffe. Systematische Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von Chemozeptoren<sup>23)</sup> zur taxonomischen Unterscheidung und Erfassung natürlicher Gattungsgruppen<sup>24)</sup>, und zur gezielten Auslösung von Verhaltensweisen durch definierte stoffliche Prinzipien sind möglich geworden, Untersuchungen, aus denen Sinnesphysiologie, Zoologie, Biochemie und deren Grenzgebiete gleichermaßen Nutzen ziehen.

## 1.2 PROBLEMSTELLUNG

Pheromone dienen dem Informationsaustausch zwischen Individuen mittels chemischer Zeichen. Orientierung in der Umwelt, Nahrungssuche und Anlockung des Sexualpartners sind wesentliche

Äußerungen tierischen Lebens. Im sozialen Insektenstaat kommt dazu die Verständigung über Arbeitsteilung und Verteidigung. Es ist daher kein Zufall, daß die bisher bekannten Pheromone Sexualduftstoffe, Wegmarkierungsstoffe, Kasten-determinationsstoffe und Alarmstoffe sind. Beispiele für Wegmarkierungsstoffe sind bei verschiedenen Insektenarten nachgewiesen. Nach LINDAUER <sup>25)</sup> geben stachellose Bienen ihren Nestgenossen neben optischer auch chemische Orientierungshilfe, um sie zu ergiebigen Futterquellen zu führen. Wie Wespen und Hummeln (HAAS 1952) <sup>26)</sup> bedienen sie sich der Sekrete der Mandibeldrüsen, um ihre Flugwege an einigen, besonders auffallenden Punkten zu markieren. Mit Hilfe ununterbrochener Duftspuren orientieren sich Ameisen und Termiten. CARTHY <sup>27)</sup>, WILSON <sup>28, 29)</sup>, MOSER <sup>30)</sup>, BLUM <sup>31, 32)</sup> und HANGARTNER <sup>33)</sup> wiesen bei Ameisen solche spurbildenden Stoffe nach, die in Alarmsekreten enthalten oder allgemein attraktiv sein können. Über ihren chemischen Charakter berichten BUTENANDT und Mitarbeiter <sup>34)</sup>, WALSH <sup>35)</sup>, WILSON <sup>36)</sup>, BLUM <sup>32)</sup>, Mc GURK <sup>37)</sup> und CAVILL <sup>38)</sup>. Nach GOETSCH <sup>39)</sup> gewinnen Duftspuren in dem Maße an Bedeutung, in dem andere Arten sozialer Verständigung durch das Medium optischer und akustischer Signale in den Hintergrund treten. Besonders ausgeprägt ist daher das Anlegen von Duftspuren bei niederen Termiten wie der Art *Zootermopsis nevadensis* Hagen, deren Augen verkümmert sind und die sich längs ausgelegter Spuren gegenseitig den Weg zu ergiebigen Futterquellen weisen. Hat nämlich ein solches Tier auf einem Erkundungszug vermoderndes Holz mit Befall bestimmter Schimmelpilze entdeckt, so legt es bei der Rückkehr zum Nest durch Anpressen des Abdomens an den Boden eine Duftspur, mit der es die Nestgenossen alarmiert und

veranlaßt, dieser Spur zu folgen. Nach Untersuchungen von LÜSCHER <sup>40)</sup> und STUART <sup>41)</sup> ist die sogenannte Sternaldrüse zwischen dem 5. und 6. Ventralsterniten Quelle der Duftspur. LÜSCHER <sup>42)</sup> konnte zeigen, daß auch Lösungsmittel-extrakte aus ganzen Termiten, besonders aber Extrakte der Sternaldrüse künstliche Spuren bilden, wenn man sie mit einer Pipette auf Papier aufträgt. Die Stoffe, die für diese eindeutige und wiederholbare Verhaltensreaktion verantwortlich sind, waren Gegenstand der vorliegenden Versuche. Sie werden im folgenden als "spurbildendes Pheromon", kurz "Spurpheromon", bezeichnet, denn sie erfüllen die einleitend zitierte Definition <sup>7)</sup>, indem sie als körpereigene Stoffe eine für Termiten spezifische Verhaltensreaktion auslösen.

Über die chemische Natur spurbildender Pheromone der Termiten herrschten bis vor kurzem nur Mutmaßungen. BECKER und PETROWITZ <sup>43)</sup> erregten daher 1967 mit der Entdeckung Aufsehen, daß Termiten Strichen von Kugelschreiberminen folgen. Die Wirkung tritt nur bei bestimmten Sorten von Minen auf. Als eigentlich spurbildende Substanzen wurden aus den Schreiberpasten Diäthylenglykolmonoäthyl- und butyläther isoliert. Dabei handelt es sich wohl um körperfremde Stoffe, die laut Definition nicht zu den echten Pheromonen gehören, da sie geringe Artspezifität besitzen und sowohl bei Zootermopsis wie bei etwa 40 anderen Termitenarten die Spurfolge-reaktion auslösen.

Ein körpereigenes, spurbildendes Pheromon, das artspezifisch ist, isolierte MOORE <sup>44)</sup> 1966 aus der australischen Termitenart *Nasutitermes exitiosus* Hill. Es ist ein diterpenoider Kohlenwasserstoff der Summenformel  $C_{20}H_{32}$  mit bisher unbekannter Struktur. Seine Wirksamkeitsgrenze wird mit  $10^{-2}$  bis

10 Mikrogramm/Milliliter Lösung angegeben. In der genauen chemischen Zusammensetzung ebenfalls ungeklärt ist ein Extrakt aus *Reticulitermes flavipes* (Kollar), den WATANABE und CASIDA <sup>45)</sup> 1963 als termitenanziehend beschrieben. Wie SMYTHE und Mitarbeiter <sup>46)</sup> fanden, ist das Spurfolgeverhalten bei *R. flavipes* und *R. virginicus* wechselseitig auslösbar durch Extrakte der Sternaldrüsen wie auch durch Gesamtextrakte aus einer bestimmten pilzbefallenen Holzsorte. 0.1 ng des gaschromatographisch gereinigten Extraktes genügen, um die Reaktion auszulösen. Eine für *Kaloterme flavicollis* (Fabr.) attraktive Substanz, cis-Hexen-(3)-ol-(1), konnte VERRON <sup>47)</sup> 1963 isolieren. Es entstammt keiner Drüse, sondern wird bei der Holzverdauung im Darm gebildet und mit dem Kot ausgeschieden.

Haben die bisherigen Ergebnisse der Pheromonforschung einen Einblick in die "Wortlehre" dieser eigenartigen chemischen Sprache vermittelt, so fehlt bislang ein logisches Verknüpfungsprinzip, eine Grammatik. Die bis heute bekannten "Wortformeln" lassen noch keinen klaren Zusammenhang zwischen chemischer Struktur und biologischer Funktion erkennen. Was den Pheromonen beim gegenwärtigen Wissensstand gemeinsam ist, sind physikalische Eigenschaften, z. B. ihre Flüchtigkeit. Ihre Molekulargewichte liegen im Bereich zwischen 100 und 300 Masseneinheiten. Das ist kein Zufall. Denn Pheromone gelangen über die Gasphase an den Ort ihrer Wirkung, d. h. an die spezialisierten Geruchsrezeptoren der Antennen. Eine weitere Gemeinsamkeit liegt möglicherweise in bestimmten Absorptionseigenschaften riechender Moleküle im fernen Ultrarot-Gebiet. Einen Ansatzpunkt in dieser Richtung liefert die Vibrationstheorie des Geruchs von DYSON (1937), die von WRIGHT <sup>48)</sup> weiterentwickelt wurde.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, mit der Anreicherung des spurbildenden Pheromons von *Zootermopsis* einen Beitrag zur Frage der chemischen Zusammensetzung zu leisten. Verbunden damit ist die Absicht, künftig mit hochwirksamen Extrakten oder reinen Stoffen elektrische Ableitungsversuche an den Termiten-antennen vorzunehmen. Ob das Termitenpheromon darüber hinaus später als wirksamer Termitenbekämpfungsstoff (Hinlocken der Termiten zu Giftfallen, Vorbeileiten an termitengefährdeten Gebäuden) praktischen Nutzen haben wird, werden weitere Arbeiten entscheiden müssen.

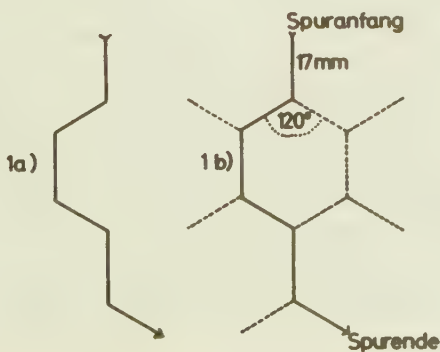
## 2.0 ALLGEMEINER TEIL

### 2.1 Der biologische Test

Um einen bestimmten Wirkstoff aus einem hohen Überschuß inaktiver Begleitstoffe zu isolieren, ist der biologische Test am Anfang der einzige Wegweiser. Denn ein Wirkstoff unbekannter Zusammensetzung gibt sich zunächst allein durch seine biologische Wirkung zu erkennen. Diese Wirkung kann sowohl morphologischer <sup>49)</sup> als auch physiologischer oder verhaltensphysiologischer <sup>3)</sup> Natur sein. Eine wesentliche Anforderung an den biologischen Test ist, daß er unter geeigneten Bedingungen reproduzierbar ist und angenähert quantitative Aussagen gestattet.

In der vorliegenden Arbeit diente als Verhaltenstest das Suchverhalten von Termiten entlang einer vorgelegten künstlichen Duftspur, in Anlehnung an LÜSCHER <sup>42)</sup>. Dieser definierte als 1 SE diejenige Menge des gelösten spurbildenden Pheromons, die auf eine Spur von 100 mm Länge bestimmter Geometrie (Abb. 1 a) aufgebracht werden mußte, um 3 von 10 Tieren zum "richtigen" Durchlaufen zu veranlassen.

**Abb. 1**  
Form der  
künstlichen  
Duftspuren  
des  
biologischen  
Tests



Die zu prüfenden Extrakte wurden jeweils so lange verdünnt, bis die Definitionsbedingungen erreicht waren. Mit dem Verdünnungsfaktor ließ sich dann auf die Gesamtaktivität bzw. die spezifische Aktivität (SE/mg) der zu prüfenden Substanz zurückrechnen.

Vorversuche hatten nun ergeben, daß Temperatur, Luftfeuchte<sup>50)</sup>, Luftbewegung<sup>51)</sup>, Lichtverhältnisse<sup>50)</sup>, Erschütterungen, Schwerkraft<sup>45)</sup> und magnetische Felder<sup>52, 53)</sup> einen Einfluß auf das Verhalten der Tiere ausüben können.

Um die Reproduzierbarkeit des Tests zu erhöhen, wurde der Einfluß der Umweltbedingungen dadurch weitgehend ausgeschaltet, daß Temperatur, Luftfeuchte, Luftbewegung, Lichtverhältnisse, die mechanische Stabilität der Unterlage (durch Schaumstoffpolster) und die ebene Lage der Laufläche in Bezug auf das Schwerfeld konstant gehalten wurden. Ausserdem wurde auf äußerste Reinheit von Glasgeräten für die Verdünnungsreihen geachtet. Die Geometrie der Spur wurde dadurch verbessert, daß symmetrisch zum Verlauf der Duftspur eine reine Lösungsmittelspur aufgetragen wurde. (Abb. 1 b, gestrichelte Linie). Damit enthält jeder Versuch auch die Kontrollspur. Um den von BECKER<sup>53)</sup> nachgewiesenen Einfluß von Luftdruckschwankungen und anderen klimatischen Bedingungen auf die Termiten zu berücksichtigen, wurde der biologische Test nur bei annähernd vergleichbaren Wetterverhältnissen durchgeführt und jeweils zuvor durch eine konstante Eichlösung auf Reproduzierbarkeit überprüft (BUTENANDT u. Mitarb.<sup>3)</sup>, WATANABE u. Mitarb.<sup>45)</sup>). Fiel der Test mit der Eichlösung anders als bei früheren Versuchen aus, so wurden am betreffenden Tag keine weiteren Versuche durchgeführt.

Vorversuche hatten ergeben, daß Soldaten und Geschlechtstiere den aufgetragenen Duftspuren weniger genau folgten als Arbeiter und Arbeiterinnen. Daher wurden Angehörige der ersten beiden Termitenkasten vor dem Test entfernt. Ein Unterschied im Verhalten von Arbeitern verschiedener Größe und verschiedener Kolonien wurde nicht beobachtet.

Als Spurträger diente sauberes Schreibmaschinenpapier, auf das mit einer öfter gereinigten Metallschablone ein dünner Bleistiftstrich als Hilfsspur zum Auftragen der Lösung eingezeichnet wurde.

Bei den in Anlehnung an LÜSCHER<sup>50)</sup> durchgeführten Tests ergaben sich folgende Nachteile :

- 1). sie erforderten sehr viel Zeit, da die zu prüfenden Lösungen jeweils so lange verdünnt und wieder neu getestet werden mußten, bis die Definitionsbedingung erfüllt war.
- 2). Tiere, die der Duftspur nur eine bestimmte Strecke folgten, z. B. weil die Spur etwas ungleichmäßig aufgetragen war, blieben bei der Auswertung unberücksichtigt. Dadurch wurde die Fehlerbreite des Tests unnötig hoch.

Dies kommt darin zum Ausdruck, daß die mittlere Abweichung des Mittelwerts bei der statistischen Auswertung von zahlreichen Testen, die mit derselben Eichlösung durchgeführt wurden, um einen Faktor 10 schwankt.

Um diese Abweichung zu vermindern, habe ich zunächst in weiteren Versuchen verschiedene Bewertungsskalen aufgestellt und verglichen. Es erwies sich als zweckmäßig, als Bewertungseinheit die Zahl richtiger Entscheidungen an den Knickpunkten der Spur zu wählen. Dabei erhält eine richtige Entscheidung am Anfang der Spur als zufällig möglich den Wert 0, zwei richtige Entscheidungen werden mit 0.05, drei richtige mit 0.1 SE usw. bewertet, wie Tabelle 1 zeigt :

Tabelle 1

| Anzahl Tiere<br>(von 10 Versuchstieren) | mit Anzahl richtiger<br>Entscheidungen an<br>den Ecken der Spur | Bewertung(SE) |                       |
|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|---------------|-----------------------|
|                                         |                                                                 | jetzt         | früher                |
| 1                                       | 0                                                               | 0             | 0                     |
| 1                                       | 1                                                               | 0             | 0                     |
| 1 - 10                                  | 2                                                               | je 0.05       | 0                     |
| 1 - 10                                  | 3                                                               | je 0.1        | 0                     |
| 1 - 10                                  | 4                                                               | je 0.2        | 0                     |
| 1                                       | 5                                                               | 0.33          | 0                     |
| 2                                       | 5                                                               | 0.66          | 0                     |
| 3                                       | 5 nach Definition                                               | ■ 1.00        | 1                     |
| 4                                       | 5                                                               | 1.33          | 1 und mehr            |
| 5                                       | 5                                                               | 5             | 1 " "                 |
| 6                                       | 5                                                               | 10            | 1 " "                 |
| 7                                       | 5                                                               | 20            | 1 " "                 |
| 8                                       | 5                                                               | 50            | laut Verdünnungsreihe |
| 9                                       | 5                                                               | 70            | "                     |
| 10                                      | 5                                                               | 100 und mehr  | "                     |

Die Bewertung von 0.33 SE bei 5 richtigen Entscheidungen pro Tier wurde gewählt, um die von LÜSCHER <sup>50)</sup> eingeführte Spureinheit beibehalten zu können : 3 Tiere x 0.33 SE = 1.00 SE.

Nach dieser Bewertungsskala wurde seit Januar 1966 gearbeitet. Sie hat sich in der Praxis bewährt und dazu beigetragen, die Streuung der Werte vom Faktor 10 auf einen Faktor von etwa 2 zu verringern. Die Wirksamkeit einer konstanten Testlösung wurde innerhalb von 2 Monaten 11 mal bestimmt. Dabei war die Spureinheit im Mittel in

$$0.113 \pm 0.0233 \mu\text{l}$$

der Testlösung enthalten. Die mittlere Abweichung s. betrug  $\pm 20.6\%$ . Damit hat sich die Genauigkeit und Zuverlässigkeit des Tests gegenüber früher wesentlich erhöht. Er wurde damit gleichzeitig den Erfordernissen von Reihenuntersuchungen angepaßt. Es ist nunmehr möglich, im Bereich hoher Aktivitäten durch einen einzigen Test Rückschlüsse auf die zu erwartende Zahl von Spureinheiten zu ziehen und so die Verdünnungsreihen nur auf den tatsächlich interessierenden Bereich zu beschränken.

Um den biologischen Test noch weiter zu verfeinern, wurden Versuche unternommen, das spurbildende Pheromon nicht mittelbar durch das Verhalten, sondern unmittelbar durch ein empfindliches physikalisches Verfahren, nämlich durch die im Rezeptor auf den Duftreiz hin entstehende Erregung nachzuweisen, meßbar in den afferenten Aktionspotentialen des ableitenden Antennennerven. Eine entsprechende Methode erarbeiteten SCHNEIDER und Mitarbeiter<sup>18)</sup> für die Wahrnehmung des Bombykols durch den Seidenspinner. Summenableitungen von der Termitenantenne \*) ergaben mit Pheromonmengen von 1500 SE bisher keine auswertbaren Elektroantennogramme. Wahrscheinlich wird die Methode, auch wenn mit ihrer Hilfe unter sehr günstigen Bedingungen Antennogramme zu erhalten sind, für Routinebestimmungen - wie etwa bei Schmetterlingen - zu aufwendig sein. Aussichtsreich dagegen erscheinen Versuche zur Ableitung einzelner Rezeptorzellen, die etwas schwieriger auszuführen sind als Summenableitungen, dafür aber das Aktionspotential eines definierten, mikroskopisch kontrollierbaren Rezeptortyps ergeben.

---

\*) durchgeführt von Dr. E. Priesner, Seewiesen.

## 2.2 MATERIALGEWINNUNG und VORVERSUCHE

### 2.2.1 Materialgewinnung:

Voraussetzung für eine chemische Bearbeitung des Termiten-spurpheromons war die Beschaffung ausreichender Mengen Ausgangsmaterial. Die im August 1963 von Herrn Prof. LÜSCHER und Herrn Prof. KARLSON in Kalifornien gesammelten Termiten wurden mit Lösungsmitteln extrahiert und ergaben die in der Tabelle 2 aufgeführten Rohextrakte. Den höchsten im biologischen Test ermittelten Pheromongehalt hatten die Ätherextrakte; die restlichen Fraktionen waren vergleichsweise wenig aktiv:

TABELLE 2

| Termiten extrahiert mit Lösungsmittel | Extraktions-Zeit (Std.) | vorliegende Gesamtaktivität (Spureinheiten $\cdot 10^6$ ) | Gewichtsmenge (g) | spezifische biologische Aktivität (Spureinheiten/mg) |
|---------------------------------------|-------------------------|-----------------------------------------------------------|-------------------|------------------------------------------------------|
| Äther                                 | 1                       | 70                                                        | 10.0              | 7000                                                 |
| Äther                                 | 2                       | 35.8                                                      | 35.8              | 1000                                                 |
| Methanol                              | -                       | 0.068                                                     | 67.9              | 1                                                    |
| 70% Äthanol                           | -                       | 1                                                         | 48.95             | 20.4                                                 |
| Summe:                                |                         | 106.87                                                    | 162.65            |                                                      |

107 Millionen Spureinheiten (SE) in insgesamt 162.6 g Substanz standen zur Verfügung. Diese Zahl scheint hoch, ist aber in Anbetracht der hohen Wirksamkeit gering, da der ganz überwiegende Teil des Extrakts aus biologisch inaktiven Begleitstoffen besteht, die es abzutrennen gilt.

### 2.2.2 Chemische und physikalisch-chemische Vorversuche:

Die Menge des Rohextrakts war begrenzt und schwer nachzubeschaffen. Daher schien es notwendig, durch orientierende Vorversuche eine Vorstellung von den Eigenschaften des Spurpheromons zu erarbeiten, wobei die Fraktionen jeweils im biologischen Test ausgewertet wurden. Diese Kenntnisse sollten dem Aufarbeitungsgang zugute kommen. Verwendet wurde im analytischen Maßstab die Lösung eines weniger wirksamen Extrakts, während die Hauptmenge für die präparative Gewinnung aufgespart blieb, bis die Zuverlässigkeit der einzelnen Aufarbeitungsschritte genügend erprobt und gesichert war. Folgende Tabelle gibt einen Überblick über die chemischen Vorversuche :

Tabelle 3

| Art der Umsetzung                                  | Agentien                                              | Temp.<br>(°C) | Reakt.-<br>dauer<br>(min.) | biol. Wirksamkeit<br>(SE) |                     | Aus-<br>beute<br>in %<br>etwa |
|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|---------------|----------------------------|---------------------------|---------------------|-------------------------------|
|                                                    |                                                       |               |                            | einge-<br>setzt           | wieder-<br>gefunden |                               |
| Acetylierung                                       | Acetan-<br>hydrid-<br>Pyridin                         | 23            | 600                        | 9500                      | 100                 | 1*                            |
| Benzoyl-<br>lierung                                | 3. 5-Di-<br>nitro-<br>benzoyl-<br>chlorid,<br>Pyridin | 23            | 300                        | 9500                      | 200                 | 2*                            |
| Rückver-<br>seifung der<br>Acetate und<br>Benzoate | CH <sub>3</sub> OH,<br>0.2 N<br>KOH, N <sub>2</sub>   | 64            | 30                         | 100                       | 5                   | 5                             |

|                                  |                                                                         |    |     |       |       |     |
|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|----|-----|-------|-------|-----|
| Verseifung<br>sauer<br>alkalisch | 0.1 N HCl<br>in CH <sub>3</sub> OH                                      | 20 | 120 | 10000 | 1000  | 10* |
|                                  | 0.2 N <sup>3</sup> KOH<br>in CH <sub>3</sub> OH<br>unter N <sub>2</sub> | 64 | 30  | 10000 | 7000  | 70  |
| Hydrierung                       | H <sub>2</sub> , Kata-<br>lyikator<br>5% Pd/C                           | 20 | 50  | 47500 | 45000 | 94  |
| Bromierung                       | 3% Br <sub>2</sub> in<br>CHCl <sub>3</sub>                              | 20 | 30  | 47500 | 300   | 0.5 |
| Girard-Um-<br>setzung            | Girard T<br>in Eis-<br>essig                                            | 90 | 40  | 9500  | 0     | 0*  |

Die mit \* gekennzeichneten Werte sind unsicher, da mitgeschleppte Spuren der verwendeten Reagenzien den biologischen Test störten.

Wie man sieht, führt die Einwirkung hydrolytischer Agentien zu Verlusten an Pheromon. Gegen katalytisch erregten Wasserstoff ist der Extrakt dagegen weitgehend beständig. Störend ist die Anwesenheit eines Fettüberschusses, dessen Verseifungsprodukte beim Ausschütteln der wässrigen Lösungen mit organischen Lösungsmitteln (Essigester, Diäthyläther, n-Pentan) Schaum bilden und die Phasentrennung erschweren. Neben den Fetten liegen unverseifbare, in organischen Medien leicht lösliche Bestandteile vor. Die Auswertung der biologischen Tests legt nahe, bei der Aufarbeitung möglichst neutrale und schonende Bedingungen zu wählen und Zusätze stark riechender Agentien zu vermeiden.

#### Physikalisch-chemische Versuche:

Während der Lagerung der Rohextrakte bei + 2°C hatten sich aus der ölig-zähflüssigen Schicht farblose, flockige Niederschläge abgeschieden. Beim Versuch, sie über eine Kühlfritte abzusaugen,

gingen sie wieder in Lösung. Auch alle Versuche, Bestandteile des Öls durch Anreiben mit wasserhaltigem Aceton oder Methanol/Äther zu kristallisieren, schlugen fehl.

Bei Verteilungsversuchen zwischen nicht mischbaren Flüssigkeiten löst sich das Spurpheromon vorwiegend in der organischen Oberphase, in der sich nach vorsichtigem Abdampfen auch der Hauptteil der gravimetrisch faßbaren Substanzmengen befindet.

Im System Äthanol (20 % Wassergehalt)/Petroläther (Volumenverhältnis 1/1) sind nach der Trennung der Schichten in der Oberphase 90 % der eingesetzten Substanzmengen wiederzufinden, aber - bedingt durch Abdampfverluste - nur etwa 10 % des ursprünglichen Pheromons. Die Unterphase enthält 10 % biologisch inaktiver Substanz. Eine Möglichkeit, zur Verringerung der Abdampfverluste die Lösungsvolumina zu verkleinern und gleichzeitig das Verhalten bei mehrfach wiederholten Verteilungsschritten zu prüfen, bietet die Methode der

Gegenstromverteilung nach CRAIG<sup>54)</sup>. Nach der Verteilung von 50 000 Spureinheiten über 20 Elemente mit je 3 ml Ober- und Unterphase des Systems  $\text{CH}_3\text{OH}(70\%)/n\text{-Hexan}$  resultierten drei Maxima mit biologischer Wirksamkeit. Sie befinden sich in der ersten, 12. und 17. bis 20. Fraktion der Oberphase, allerdings in geringer Gesamtausbeute von 1 %. Auch bei vorsichtigem Kippen der Verteilerelemente erschwert die Bildung von Emulsionen die Phasentrennung. Nachteilig erscheinen die Öffnungen zum Übertritt der Oberphase in das jeweils nächste Verteilungselement, die während des 3 Stunden dauernden Versuchs flüchtigen Bestandteilen den Durchtritt an die umgebende Luft ermöglichen. Eine signifikante Verstärkung der Spurwirkung beim Wiedervereinen aliquoter Teile der getrennten Fraktionen 1 + 20 tritt nicht ein.

### Versuche mit chromatographischen Methoden:

Die Dünnschichtchromatographie half seit ihrer Einführung durch STAHL<sup>56)</sup> 1956 bei der analytischen Charakterisierung vieler Naturstoffe. Schnelligkeit und leichte Identifizierung der substanzhaltigen Zonen - auch bei präparativer Arbeitsweise - machten sie zu einem nützlichen Hilfsmittel. Die Dünnschichtchromatogramme an Kieselgel HF 254 + 350 in Abb. 2 zeigen die unterschiedliche Auftrennung von Termitenextrakt in Fließmittelsystemen steigender Polarität. Im System Cyclohexan/Dichlormethan/Aceton = 9/3/1 sind neun Flecke nachweisbar mit  $R_f$ -Werten zwischen 0.07 und 0.94. Das Aktivitätsprofil der mit  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH} = 9/1$  eluierten, in 10 Abschnitte unterteilten Sorptionsschicht weist (Abb. 3) drei biologisch wirksame Zonen auf, je eine am Start, an der Front und eine weitere zwischen  $R_f = 0.26$  und 0.53 mit 85 % der insgesamt eluierten Wirksamkeit. Wie bei der Gegenstromverteilung ist die Gesamtausbeute gering (1.8 %). Die verlorene Hauptmenge befindet sich im Papier, mit dem die Kammer ausgeschlagen ist, und in der Fließmittelschicht am Boden der Kammer. Versuche mit schneller laufenden Systemen wie n-Pentan (Laufzeit : 18 min.) und Pentan/Cyclohexan/Diäthyläther = 40/6/4 (Laufzeit: 30 min.) ergaben weder bei Normaltemperatur noch bei 20°C wesentlich bessere Ausbeuten.

### Säulenchromatographie:

Nahezu quantitative Ausbeuten lassen sich beim Übergang von der "offenen Säule", der Dünnschicht, auf das geschlossene System des herkömmlichen Kolonnenrohres erzielen - um den Preis der Trennschärfe. Schon 4 x 5 ml n-Pentan eluierten das Pheromon innerhalb der ersten bis vierten Fraktion, sowohl von kristalliner Cellulose<sup>60)</sup> als auch von Acetylcellulose (siehe Abb. 4 a).

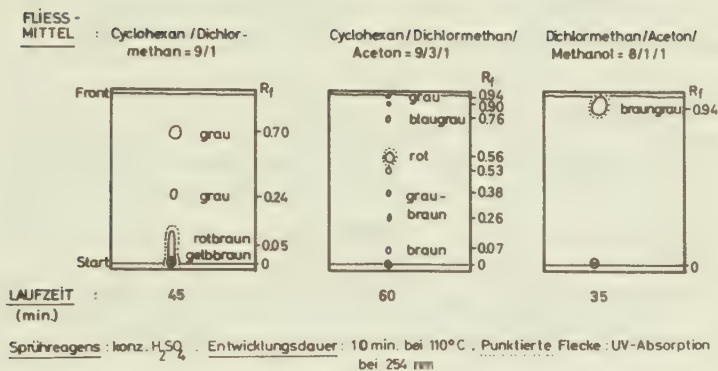


Abb. 2: Ermittlung eines Fließmittels zur optimalen Auftrennung auf der  $SiO_2$ -Schicht.

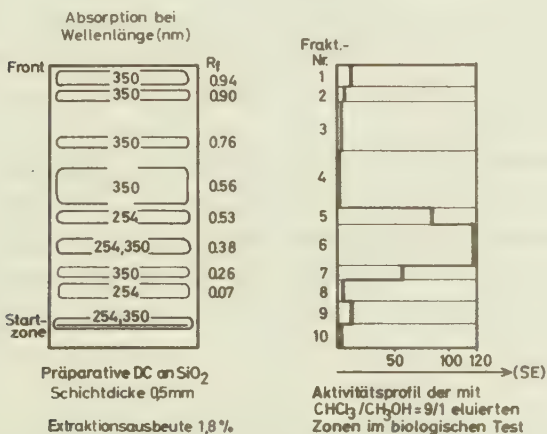


Abb. 3: Lage der biologisch aktiven Zonen im Dünnschicht-chromatogramm.

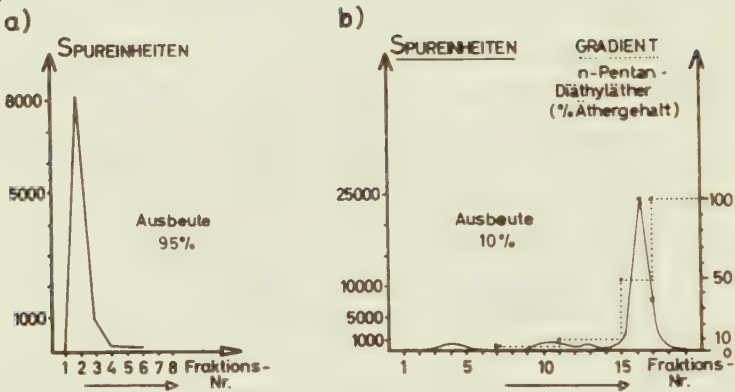


Abb. 4 : Säulenchromatographie

Elutionsprofile an a) kristallisierter Cellulose<sup>60)</sup> (AVICEL) und Acetylcellulose mit n-Pentan

sowie b) an KIESELGEL 0,05 - 0,2 mm Korngröße mit n-Pentan-Diäthyläther-Gradient

Säulen mit anorganischen Adsorbentien hoher Retentionskraft wie  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , Aktivitätsstufe 5, hielten das Pheromon irreversibel gebunden. Von Kieselgel läßt sich das Pheromon mit einem Pentan-Äthergradienten steigender Polarität bei 50 % Äthergehalt zu etwa 10 % eluieren (Abb. 4 b).

### Gaschromatographie:

Die Chromatographie in der Gasphase verbindet Schnelligkeit, Trennschärfe und hohe Nachweisempfindlichkeit mit den Vorteilen des geschlossenen Systems und - neuerdings - mit substanzspezifischen Detektoren. Manche Substanzen lassen sich in hoher Ausbeute präparativ reinigen und rechromatographieren. Bei orientierenden Auftrennversuchen an einer Didecylphthalat-Säule (30 % Flüssigphase auf Träger Chromosorb W) wies der Wärmeleitfähigkeitsdetektor 10 getrennte Substanzgipfel mit Retentionszeiten zwischen 10 und 45 min. nach. Auf die Eluate von zweien dieser Gipfel mit 16 und 44 min. Retentionszeit sprachen die Termiten an. Die Gesamtausbeute ließ sich nicht über 30 % steigern, auch wenn die Vorlage mit Aceton-Trockeneis oder mit flüssigem Stickstoff gekühlt war. Wurde die Trenntemperatur auf mehr als 100 °C erhöht, in der Absicht, stärker absorbierte Bestandteile zu eluieren, so störte die in Spuren abdampfende und in der Vorlage kondensierende Flüssigphase den biologischen Test. Einige der biologisch inaktiven Gipfel wurden als n-Alkane aus dem Lösungsmittel Petroläther identifiziert, das daraufhin einer sorgfältigen Reinigung durch mehrfache Destillation unterworfen wurde. Ein Versuch, höher siedende Anteile des Extrakts durch Trennung an einer Säule mit 10 % Apiezon L bei 250 °C zu erfassen, scheiterte an der Anwesenheit überschüssiger Fette im Rohextrakt. Diese verzögerten die notwendige rasche Verdampfung der Probe im Einspritzblock und gaben zur Ausbildung breiter Gipfel mit mittleren Retentionszeiten von 25 und 52 min. Anlaß. Die Ausbeute im Apiezon-System lag bei maximal 10 %.

Versuche zur Temperaturstabilität bestätigten eine Beobachtung von LÜSCHER<sup>42)</sup>, der beim Erhitzen des Termitenextrakts nach 15 min. noch volle Wirksamkeit nachweisen konnte. Im geschlossenen Glasrohr übersteht die Probe 30 min. lang Temperaturen bis maximal 150° C.

### Flüchtigkeit:

Auf Papier aufgetragene Rohextrakte sind im bedeckten Zustand einige Tage haltbar. Spuren von Extrakten, die von Lipoiden befreit sind, verflüchtigen sich schneller. Die Spurwirksamkeit fällt, wie Abb. 5 zeigt, schon nach 20 Std. auf 1 %, nach 72 Std. auf 0,01 % des ursprünglichen Wertes - ein weiterer Hinweis auf die Flüchtigkeit des Pheromons.

Eine Bestätigung dieser Beobachtung läßt sich aus Versuchen zur Vakuumsublimation herleiten. Wird eine Probe des Rohextrakts bei einem Druck von 1 Torr eine Stunde auf  $100^{\circ}\text{C}$  erhitzt, so befinden sich etwa 25 % der eingesetzten Aktivität als dünner Beschlag am Kühlfinger, der auf  $-70^{\circ}\text{C}$  abgekühlt war. Die Gewichtsabnahme war dabei nicht exakt zu erfassen und lag unter  $1/10$  mg.

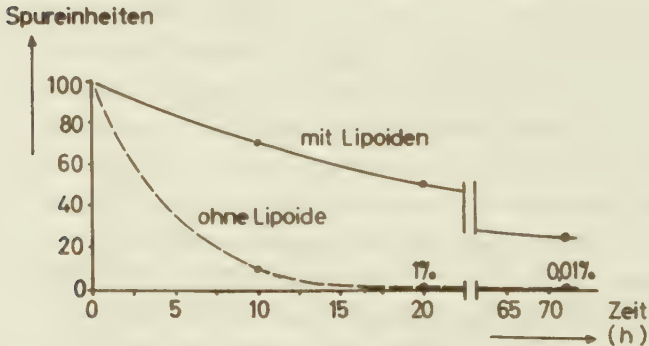


Abb. 5: Zum zeitlichen Abfallen der Spurwirksamkeit lipoidhaltiger und lipoidfreier Extrakte.

Die Wasserdampfdestillation eignet sich ausgezeichnet zur Abtrennung flüchtiger Bestandteile aus einem Überschuß nicht-flüchtiger Ballast-Stoffe. Ihre Anwendung reicht von technischen Maßstäben bis zur Herstellung von Riechstoffen und ätherischen Ölen aus Pflanzenteilen.

Aus einer Probe von 9500 Spureinheiten hatten sich nach drei Minuten bereits 80 - 90 % des Pheromons verflüchtigt und waren in die Vorlage übergetrieben<sup>57)</sup>. Aus dem wäßrigen Destillat ließ sich das Pheromon leicht mit organischen Lösungsmitteln ausschütteln. Im Rückstand blieben biologisch inaktive Fette.

#### Spektrometrische Versuche am flüssigen Rohextrakt:

Die spektrometrischen Befunde (Tab. 4a u. 4b) lassen auf eine Vielzahl von Bestandteilen schließen. Es müssen freie Alkane und Alkene mit einer Mindestlänge von 4 C-Einheiten oder entsprechend langkettige Reste vorliegen. Neben einem hohen Gehalt an Estern fällt die Anwesenheit von Aromaten auf.

Tabelle 4a

| Banden im IR-Bereich bei Wellenzahlen ( $\text{cm}^{-1}$ ) | Zugehörige Gruppe (Deutung nach SILVERSTEIN et al. <sup>58)</sup> )                     |
|------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| 3400 (breit)                                               | -OH oder Wassergehalt                                                                   |
| 2920 (scharf)                                              | -CH <sub>2</sub> }<br>-CH <sub>3</sub> } -Valenzschwingungen                            |
| 2850 (scharf)                                              |                                                                                         |
| 1740 (scharf)                                              | Esterbanden                                                                             |
| 1150 (mittel)                                              |                                                                                         |
| 1630 (schwach)                                             | -C=C-Doppelbindungen                                                                    |
| 1450 (mittel)                                              | -CH <sub>2</sub> } -Deformations-<br>-CH <sub>3</sub> } schwingungen                    |
| 1330 (mittel)                                              |                                                                                         |
| 720 (mittel)                                               | (-CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> , wobei $n \geq 4 \rightarrow$<br>"rocking"-Schwingung |

Tabelle 4b

| Banden im UV-Bereich bei Wellenlänge (nm) | Deutung                         |
|-------------------------------------------|---------------------------------|
| 217                                       | konjugierte C=C-Doppelbindungen |
| 221 u. 228 (Schultern)                    |                                 |
| 249                                       |                                 |
| 268                                       |                                 |
| 273                                       | aromatische Systeme             |
| 282                                       |                                 |
| 287 293 301                               |                                 |

Zusammenfassend charakterisieren diese Versuche den pheromonhaltigen Extrakt als Stoffgemisch, das verseifbare Neutralfette, ungesättigte und aromatische Stoffe sowie wasserdampf-flüchtige Bestandteile hoher biologischer Aktivität enthält. Das Gemisch bleibt bei 100 - 150°C im geschlossenen System biologisch wirksam. Die aktiven Bestandteile sind an der Luft bei Zimmertemperatur etwas, im Vakuum bei 100°C merklich flüchtig, mit organischen Lösungsmitteln aus wässriger Phase leicht extrahierbar, gegen hydrolytische Agentien und anorganische Trägerstoffe hoher Adsorptionskraft empfindlich und bei präparativen gaschromatographischen Auffangversuchen mit 30 % Ausbeute zurückzugewinnen.

### 2.3 Näherungsberechnung der Spurstoffeinheit und der zu erwartenden Pheromonmenge

Die Menge der verfügbaren Zootermopsis-Extrakte war begrenzt. Nur wenige Milligramm Ausbeute an Wirkstoff waren zu erwarten. MOORE<sup>44)</sup> konnte aus etwa der 7-fachen Ausgangsmenge (> 10 kg) der australischen Termitenart *Nasutitermes exitiosus* Hill nur einige mg eines farblosen, hochaktiven Öls isolieren (entsprechend 0,25 Teilen Spurpheromon aus 10<sup>6</sup> Gewichtsteilen Termiten).

Ebenfalls zu Ausbeuten in der Größenordnung weniger mg führen folgende überschlagsmäßige Berechnungen für Zootermopsis:

1 Termite wiegt 10 - 20 mg; die pheromonsezernierende Sternaldrüse (etwa 1 % des Körpergewichts) wiegt bei einem Volumen von etwa 0,1 mm<sup>3</sup> 0,1 mg, eine Dichte des Gewebes von 1,0(g/cm<sup>3</sup>) angenommen. Die Drüse enthalte 10 Gewichtsprozent spurstoffhaltige Lipide = 0,01 mg. Etwa 1 % des Lipoids bestehe aus reinem Spurpheromon. Eine Termite enthält also 0,01 / 1000 mg des Spurpheromons = 0,1 µg.

Nach Extirpations- und Extraktionsversuchen von LÜSCHER<sup>50)</sup> entspricht diese Menge von 0,1 µg Pheromon etwa 5000 SE.

$$1 \text{ SE} = 2 \cdot 10^{-5} \mu\text{g} = 2 \cdot 10^{-2} \text{ ng}$$

Bei der Aufarbeitung von 1,6 kg Termiten fielen  $107 \cdot 10^6$  SE an. Die zu erwartende Pheromonmenge beträgt also  $107 \cdot 10^6 \cdot 2 \cdot 10^{-5} = 2 \text{ mg}$ , eine theoretische Extraktionsausbeute von 100 % vorausgesetzt. Bezogen auf das Termitenfrischgewicht entsprechen 2 mg des reinen Pheromons einem Anreicherungs-faktor von  $1,6 \cdot 10^6 / 2 = 800 \text{ 000}$ , bezogen auf die verfügbare Menge von 162,6 g einer Anreicherung von etwa 80 000.

Bei der Aufarbeitung des Insektenhäutungshormons Ecdyson waren gleichfalls Anreicherungen um den Faktor  $10^6$  bis  $10^7$  erforderlich<sup>59)</sup>. Hier wurde das Ziel durch Lösungsmittelextraktion, mehrfache Säulenchromatographie und Gegenstromverteilung erreicht; aus den hochaktiven Fraktionen kristallisierte schließlich das reine Hormon aus. Im Falle des Seidenspinnerlockstoffs Bombykol kam die Überführung in ein Esterderivat, dessen chromatographische Abtrennung und schließliche Rückverseifung zum freien Lockstoffalkohol der Isolierung sehr zustatten.

## 2.4 Planung der Aufarbeitungsschritte

Die besprochenen orientierenden Versuchsergebnisse zum Spurpheromon der Termiten nun machen einen Erfolg auf einem analogen Aufarbeitungsweg unwahrscheinlich. Die Aufgabe besteht also darin, die ausgeprägten Eigenschaften des Pheromons, seine Flüchtigkeit und sein hohes Lösungsvermögen in organischen Lösungsmitteln zur Aufarbeitung auszunützen. Die Frage, in welcher Reihenfolge die geplanten Aufarbeitungsschritte aufeinander folgen sollten, klärt sich bei Beachtung folgender Forderungen:

- 1) hohe Ausbeuten in den ersten Stufen erforderlich,  
geringere Ausbeuten nur in den letzten Stufen tragbar
- 2) hohe Anreicherungsfaktoren erwünscht
- 3) geschlossene Apparaturen notwendig
- 4) einfache und schnell ausführbare Verfahren sind zu  
bevorzugen

Die Entscheidung für die Reihenfolge:

- 1) Wasserdampfdestillation des Rohextrakts
- 2) Lösungsmittlextraktion des Wasserdampfdestillats
- 3) Einengen des Lösungsmittlextrakts auf kleinstmögliches  
Volumen
- 4) Destillation der konzentrierten Lösung im Vakuum
- 5) Weiterverarbeitung der destillierten Fraktionen

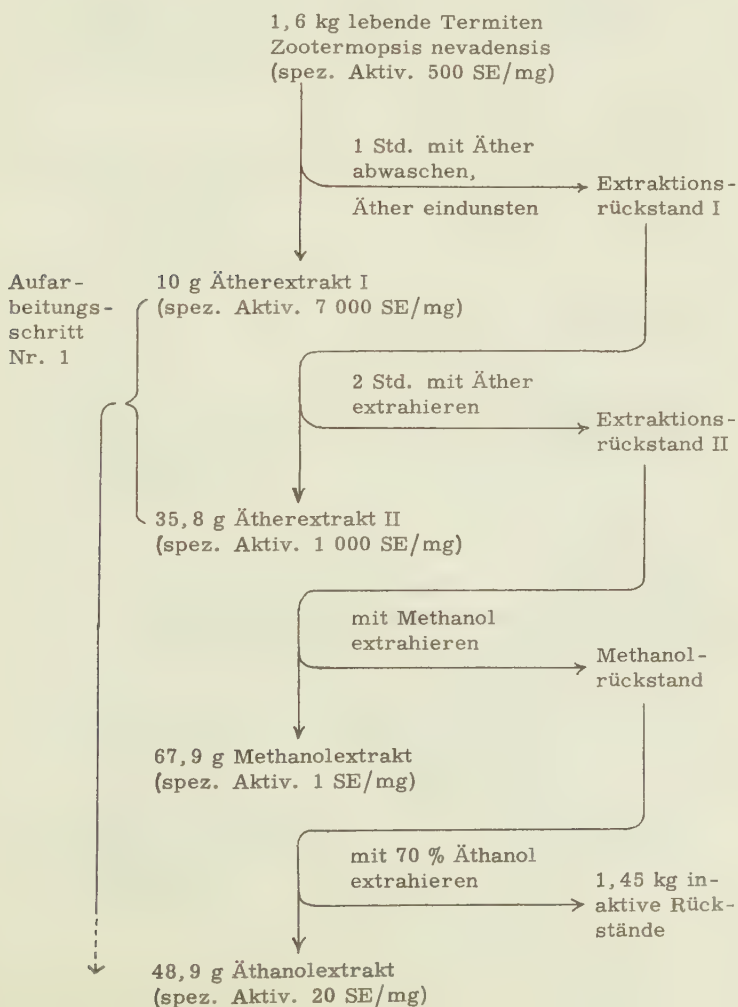
führte, wie im folgenden beschrieben, zu beträchtlicher Anreicherung und zur Identifizierung einiger wichtiger Komponenten des Gemisches. Die Schwierigkeiten, die Vorhaben dieser Art entgegenstehen, schildern anschaulich SCHILDKNECHT<sup>75)</sup> und BAYER<sup>88)</sup>.

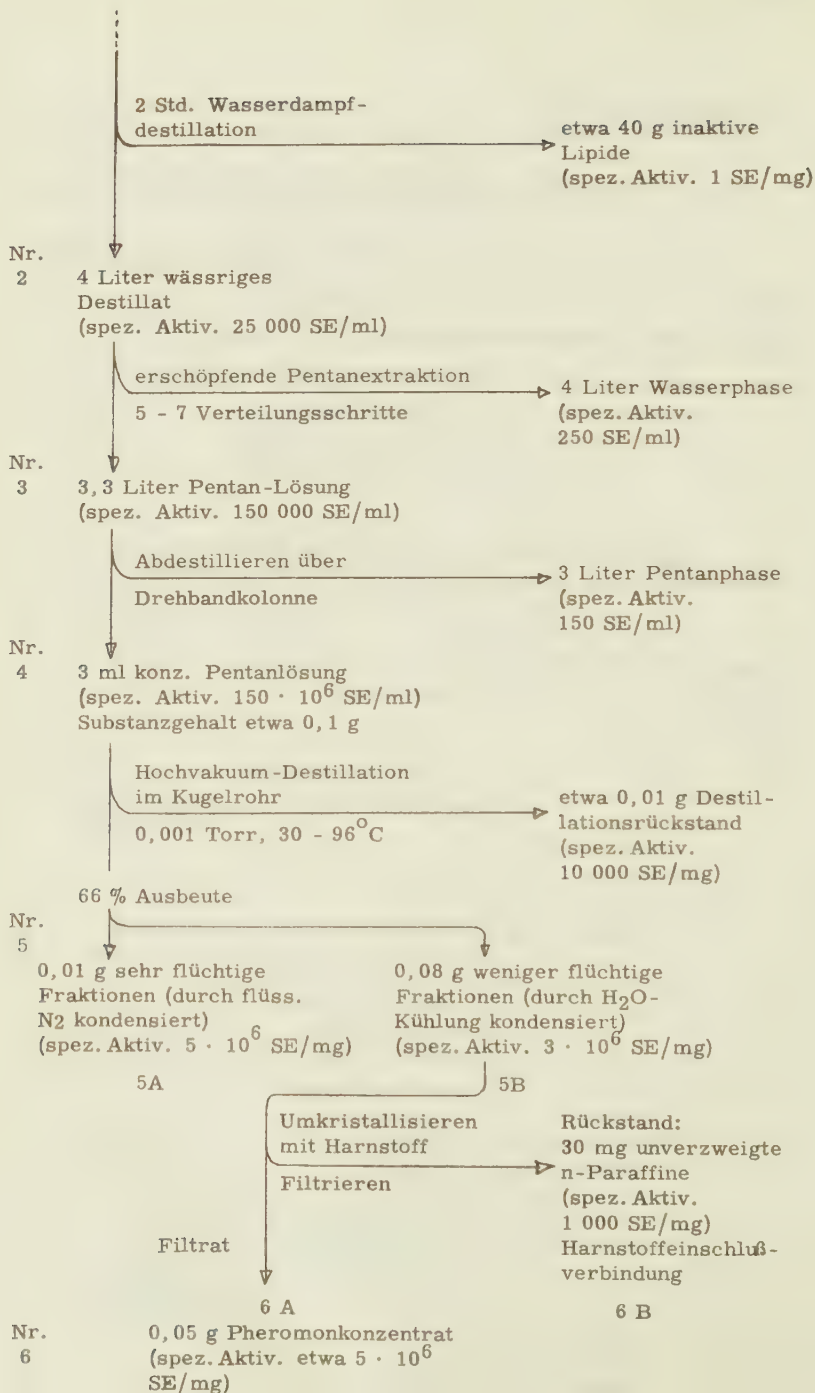
### 3.0 ERGEBNISSE

#### 3.1 Anreicherung des Spurpheromons aus Termitengesamtextrakten

Das folgende Schema gibt eine Übersicht über die Aufarbeitungsschritte:

Schema: Anreicherungs-schritte des Spurpheromons





### 3.2 Die Aufarbeitungsschritte im Einzelnen<sup>⌘</sup>

Die als Schritt 1 angegebene Lösungsmittlextraktion führte Prof. LÜSCHER in Kalifornien aus. Die weitere Anreicherung wurde am Beispiel der am wenigsten wirksamen Fraktion, dem Äthanolextrakt, studiert. Die Aufarbeitung der aktiveren Fraktionen wurde entsprechend durchgeführt. Die Zahlen des folgenden Abschnitts sind Näherungswerte, die dem biologischen Test entnommen und daher mit einem Fehler behaftet sind, der einem Faktor von etwa 2 entspricht. Die Werte für Anreicherungsfaktoren beziehen sich auf Gewichte. Gewogen wurden nicht getrocknete Eindampfrückstände. Die Herstellung völlig lösungsmittelfreier Fraktionen hätte angesichts der großen Flüchtigkeit zu hohe Verluste verursacht.

#### 3.2.1 Wasserdampfdestillation

Als Methode zur Abtrennung der flüchtigen Substanzen schien die Wasserdampfdestillation geeignet. Abbildung 6 zeigt die hierzu verwendete Apparatur. In einem Blechgefäß unter einem Überdruck von 1 m Wassersäule erzeugter Wasserdampf durchströmt einen Überhitzer und wird dann in den Schliffkolben mit Pheromonextrakt geleitet. Das Destillat kondensiert sich zum größten Teil in der eiswassergekühlten Vorlage 1. Der Rest des Dampfes wird in der 2. Vorlage mit Aceton-Trockeneiskühlung zurückgehalten. Zusätze von Anti-Schaummitteln wie n-Octanol zum Destillationsgut vermindern zwar die lästige Schaumbildung, gehen aber mit in die Vorlage über und stören die nachträgliche biologische Auswertung empfindlich (Termiten werden durch octanolhaltige Proben

---

<sup>⌘</sup> auszugsweise vorgetragen bei der 5. Tagung der Deutschsprachigen Sektion der Internationalen Union zum Studium der sozialen Insekten e. V., Bonn, 9. - 13. 10. 1967.

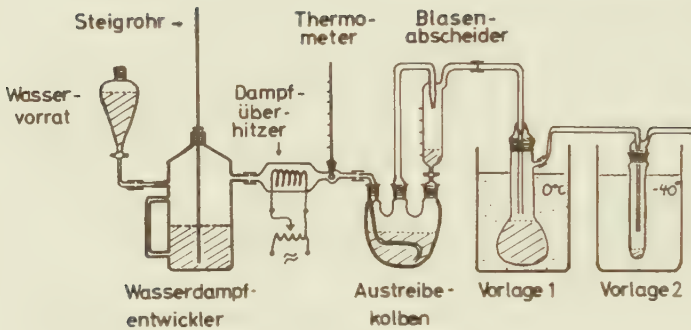


Abb. 6: Apparatur zur Destillation mit überhitztem Wasserdampf

von der Spur abgeschreckt). Abhilfe schafft tangenciales Ein-leiten des Dampfstromes. Der lipoidreiche Kolbengehalt gerät dabei in Rotation. Blasen, die dennoch übergehen, lösen sich in einem nachfolgenden, beheizten Tropftrichter auf, dessen flüs-siger Inhalt von Zeit zu Zeit in den Austreibkolben zurückgeleitet wird. Die Verwendung von Heißdampf ( $130^{\circ}\text{C}$ ) verhindert jede überflüssige Kondensation von Wasser vor der Stelle, an der sie erwünscht ist: der Vorlage. Versuche ergaben, daß sich im Inhalt der Vorlage 2 nur etwa 1 % der Pheromonmenge gegen-über 99 % in der Vorlage 1 finden. Im Rückstand der Wasser-lampfdistillation verbleiben nach 2 Stunden Pheromonreste von etwa 40 000 SE = 1 SE/mg. Sie sind zu vernachlässigen.

### 3.2.2 n-Pentanextraktion

Die biologisch wirksamen Bestandteile im stark riechenden Kondensat der ersten Vorlage lassen sich mit Pentanmengen vom halben Volumen der Wasserphase in 2 bis 3 Schritten ausschütteln. Da bei dieser Extraktion große Mengen Pentanlösung anfallen, deren nachfolgendes vorsichtiges Abdampfen sehr zeitraubend ist, wurde das Verteilungsverhalten näher untersucht. Dabei ergab sich, daß bei 23°C 5 Verteilungsschritte mit je 1/10 Volumen Pentan genügen, um über 99 % des Pheromongehaltes zu extrahieren. Den relativen Abfall des Pheromongehalts in der organischen Phase zeigt Abbildung 7:

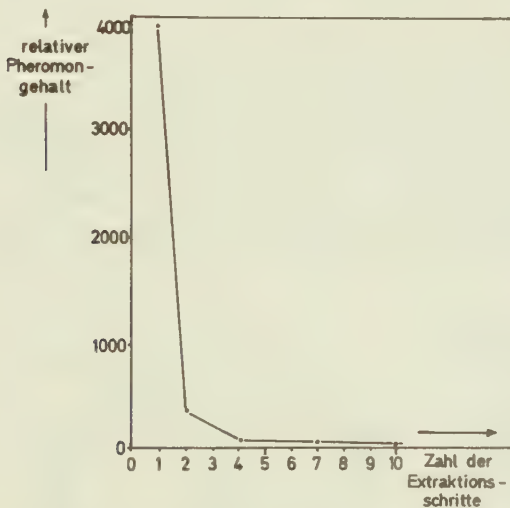


Abb. 7: Zum Abfallen des Pheromongehalts eines Wasserdampfdestillats mit der Zahl der Extraktionsschritte

Der Nernst'sche Verteilungskoeffizient  $K = \frac{C_{\text{Oberphase}}}{C_{\text{Unterphase}}}$  läßt sich daraus nach HECKER<sup>55)</sup> errechnen.

Er hat für  $23^{\circ}\text{C}$  den Wert  $K_{23}^{\circ} = 6,8$  und sinkt bei Extraktionen in der Kälte auf  $K_2^{\circ} = 1,08$ . Der Verteilungskoeffizient des Pheromons ist also stark temperaturabhängig und liegt bei Zimmertemperatur weiter zugunsten der organischen Phase als bei Kühlraumtemperatur.

Frisch geglühtes  $\text{MgSO}_4$  diente als Trockenmittel für die vereinigten Pentanphasen, die nach häufigem Umschütteln rasch über ein Wattefilter kleiner Oberfläche vom  $\text{MgSO}_4$  befreit wurden. Faltenfilter aus Papier eigneten sich für diese Filtration nicht, da sie trotz mehrfachem Nachwaschen mit reinem Lösungsmittel zu viel Pheromon festhielten.

### 3.2.3 Eindampfen der n-Pentanlösung

Zum Einengen der trockenen Pentanlösung schien der Rotationsverdampfer geeignet. Unter Vakuum ließen sich in den eisgekühlten Vorlagekolben etwa  $3/4$  der Lösungsmittelmenge übertreiben. Der Rest des Pentans befand sich in 2 hintereinandergeschalteten, auf  $-40^{\circ}\text{C}$  gekühlten Fallen, die den Rotationsverdampfer mit der Wasserstrahlpumpe verbanden (siehe Abb. 8).

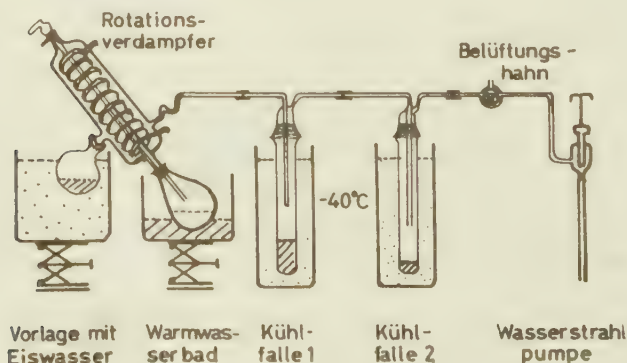


Abb. 8: Apparatur zum fraktionierten Einengen der pheromonhaltigen Pentanlösung

Während der Inhalt der Falle 1 für Termiten noch spurwirksam war, enthielt die Falle 2 reines, unwirksames Pentan. Das Pheromon ist demnach bei  $-40^{\circ}\text{C}$  nicht mehr flüchtig. Die Beobachtung veranlaßte dazu, das Abdampfen des Pentans fraktioniert auszuführen, indem der stark pheromonhaltige Inhalt der Vorlage und der ersten Falle mehrmals in den Verdampferkolben zurückgegeben und erneut abdestilliert wurde. Ein Nachteil dieses Verfahrens sind die Unterbrechungen, die zum Belüften des Systems und zum Umgießen der spurstoffhaltigen Lösungen nötig sind und die die Forderung nach Arbeitsgängen im "geschlossenen System" verletzen, also ausbeutemindernd wirken. Die Aufgabe besteht nun darin, den Rest des Lösungsmittels aus den eingengten Pentanlösungen unter minimalem Pheromonverlust zu entfernen. Eine wärmeisolierte Glasfüllkörperkolonne wurde diesem Trennproblem nicht gerecht.

Bei Destillation unter Normaldruck hielten die Füllkörper einen Teil des pheromonhaltigen Pentandampfes gebunden. Er kondensierte beim Abkühlen wieder in den Destillationskolben zurück. Das Endvolumen ließ sich daher nicht stärker einengen als auf 10 ml. Bei Destillation unter Vakuum reichte die Trennleistung der Kolonne nicht aus, so daß Spurpheromon in die Vorlage gelangte. Die geschilderten Nachteile erwachsen aus dem hohen Totvolumen der üblichen Füllkörperkolonnen, das für eine genügende innere Austauschfläche auf den Füllkörpern Voraussetzung ist.

Die Drehbandkolonne, bei der eine rasch rotierende Stahldrahtwendel im Lumen der Kolonne die Funktion der Füllkörper übernimmt, vereinigt die Vorteile hoher Trennleistung mit kleiner innerer Oberfläche und minimalem Totvolumen. Vorversuche mit kleinen Pheromonmengen von 1 000 SE ergaben, daß bei Rücklaufverhältnissen von 1:5 bis 1:10 weniger als 0,1 % der Wirksamkeit in die Vorlage übergehen. Die rotierende Stahldrahtwendel hält praktisch kein Pheromon fest - im Gegensatz zu Glasfüllkörpern herkömmlicher Kolonnen. So gelang es, Pentanlösungen mit Volumina von 1 Liter ohne merkliche Verluste bis

auf ein Endvolumen von etwa 1 ml zu konzentrieren, ohne den Destillationsvorgang unterbrechen zu müssen. Die Vorteile des "geschlossenen Systems" und der einfachen Bedienung wogen den Nachteil des längeren Zeitbedarfs (1 Tag/2 Liter Lösung) bei weitem auf.

Die Nachprüfung des Pheromongehalts dieser konzentrierten Lösung hatte ein überraschendes Ergebnis: Mehrere Bestimmungen an verschiedenen Tagen führten zu einem Wert, der reproduzierbar um einen Faktor 5 höher lag als der Ausgangswert. Die absolute Pheromonmenge hatte also während der 3 Aufarbeitungsschritte (Wasserdampfdestillation, Lösungsmittelextraktion und Abtrennung des Lösungsmittels) scheinbar zugenommen. Da weder die chromschwefelsäuregespülten Apparaturen noch die Lösungsmittel biologisch wirksame Verunreinigungen enthielten, wie ein Blindversuch zeigte, blieben 3 Möglichkeiten, um die überschüssige Pheromonbilanz zu erklären:

1. Der ursprüngliche Rohextrakt enthält Substanzen, die einen Teil der Pheromonwirkung durch abschreckende Prinzipien (im englischen Schrifttum: repellents) überkompensieren oder durch sog. "Maskierung" löschen. Maskierende Substanzen sind auf dem Gebiet der Sexuallockstoffe bekannt und von JACOBSON<sup>61)</sup> beschrieben.
2. Der Rohextrakt enthält inaktive Substanzen, die während der Aufarbeitung in eine aktivere Form übergehen.
3. Der Rohextrakt enthält Stoffe, die den Wirkstoffgehalt scheinbar nach außen hin vermindern, indem sie z.B. dessen Flüchtigkeit herabsetzen.

Da der Rohextrakt absichtlich schonend aufgearbeitet wurde und nicht mit Agentien in Berührung kam, die für eine chemische Umwandlung inaktiver in aktive Bestandteile in Frage kamen, schied die Möglichkeit 2 aus. Ob Punkt 1 eine Rolle spielt, ist ungeklärt. Für die Möglichkeit 3 sprechen zwei Beobachtungen:

1. Beim Auftragen von Rohextraktspuren auf Papier war im schräg einfallenden Licht stets eine schwach sichtbare Fettspur zurückgeblieben. Für das Pheromonkonzentrat traf das nicht zu.
2. Bei einem Vergleich der Beständigkeit von Spuren aus Rohextrakt und aufgearbeitetem Konzentrat ergab sich der im Abschnitt 2.2.2 Abb. 5 dargestellte Befund: Spuren des fetthaltigen Rohextrakts behalten ihre biologische Wirksamkeit länger.

Diese Befunde sprechen dafür, daß die Termitenfette des Rohextrakts die Flüchtigkeit des Spurpheromons vermindern, also ähnlich wirken wie fixierende Bestandteile in Riechstoffen. Ist die Flüchtigkeit nach Abtrennung dieser Fette erhöht, so erscheint die Wirksamkeit erhöht. In Wirklichkeit ist die absolute Anzahl der Moleküle konstant geblieben. Erhöht hat sich nur ihre aktuelle Konzentration. Ein Zusatz von hochreinem Paraffinöl\* (Qualität zur Spektroskopie) vermindert wie erwartet die Spurwirkung und stützt die vorangehende Überlegung.

---

\* Paraffinöl der Qualität "pro injectione" verstärkt die Spurwirkung. Im Blindversuch hat diese Substanz eine Eigenwirkung von 0,65 SE/mg, ein Hinweis darauf, einen wie starken Einfluß auf den Verhaltenstest spurenweise Verunreinigungen haben können.

### 3.3 Erreichte Anreicherung und Ausbeuten

Bezogen auf eine Ausgangssubstanzmenge von 1,6 kg Termiten waren die Ätherfraktionen um einen Faktor 35 vorangereichert. Tabelle 5 gibt einen Überblick über die Anreicherungsfaktoren der weiteren Schritte.

Tabelle 5

| Aufarbeitungsschritt<br>Nr.           | Substanzmenge<br>(g) | nach Aufarbeitung<br>erhaltene Menge in<br>(g) | Anreicherungsfaktor | Ausbeute<br>(%) |
|---------------------------------------|----------------------|------------------------------------------------|---------------------|-----------------|
| (1) Ätherextraktion                   | 1 600                | 45,8                                           | 35                  | jeweils         |
| (2) Wasserdampfdestillation           | 45,8                 | 0,1                                            | 460                 | etwa            |
| (3) Verteilung zwischen Wasser-Pentan |                      |                                                |                     | 99              |
| (4) Abdampfen der Pentan-Lösung       |                      |                                                |                     |                 |

Der Anreicherungsfaktor 460 errechnet sich aus den Schritten 2 bis 4 gemeinsam und läßt sich der Schwierigkeiten mit der Auswaage flüchtiger Lösungen wegen nicht weiter auf die Einzelschritte aufteilen. Der ursprüngliche Pheromongehalt der Termiten liegt also in  $35 \cdot 460 = 16\,000$  fach angereicherter Form vor. Die Verluste während der Aufarbeitung betragen weniger als 10 %.

Die aus den Ätherextrakten I und II gewonnene Pheromonlösung in Pentan ist das Grundmaterial für die weiteren Untersuchungen und wird im folgenden "Pheromonkonzentrat" genannt.

### 3.4 Versuche zur Identifizierung einiger Fremdstoffe

#### 3.4.1 Dünnschichtchromatographie

Eine erste grobe Auftrennung des Pheromonkonzentrats mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie ergab 11 Substanzflecke, von denen die bei  $R_f$ -Werten um 0,09, 0,53, 0,58 und 0,83 starke UV-Absorption bei 254 nm Wellenlänge zeigten. Mit 50 %iger  $H_2SO_4$  färbten sich die Flecke bei  $R_f$  0,58 und 0,69 intensiv rotviolett an und entsprachen in  $R_f$ -Werten und Farbe den Flecken der DC im Kapitel Vorversuche. Diese hatten bereits eine hohe Aktivität im Bereich von  $R_f$ -Werten um 0,4 ergeben.

Als Vergleichsubstanzen sind Phthalsäuredidecylester, Cholesterin, Squalen und die Paraffine Octan, Tetradecan, Octadecan und Eicosan in der Abbildung 9 eingetragen sowie die Carbonsäuren Ameisensäure, Propionsäure, n-Caprinsäure und n-Octansäure. Phthalsäuredidecylester zeigt eine starke UV-Absorption bei 254 nm und färbt sich mit  $H_2SO_4$  ebenso rotviolett an wie der Fleck um  $R_f$  0,58 und 0,69 des Pheromonkonzentrats. Beim Besprühen mit  $H_2SO_4$  bleiben die Paraffine auch bei 110°C unverändert. Sie lassen sich aber auf derselben Platte als tiefgelbe Flecke auf blauer, später gelblicher  $SiO_2$ -Schicht nachweisen, wenn man sie mit einer alkalischen Bromthymolblau-Lösung besprüht. Der entsprechende Teil der Platte bleibt während der  $H_2SO_4$ -Behandlung abgedeckt. Dasselbe gilt für die Carbonsäuren.

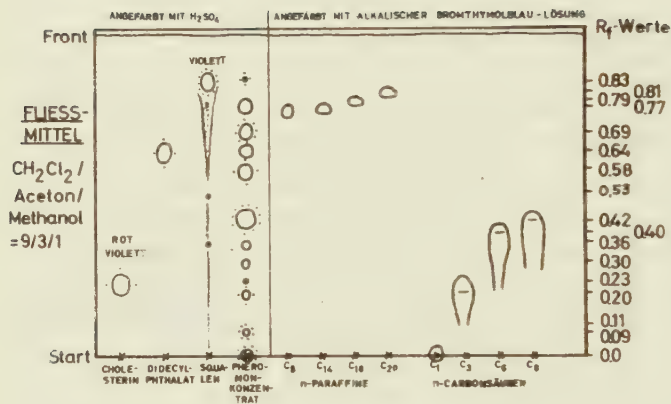


Abb. 9: DC des Pheromonkonzentrats und einiger Vergleichs-  
substanzen

### 3.4.2 Gaschromatographische Versuche

Das Pheromonkonzentrat besteht, wie die Vorversuche und die DC-Versuche ergaben, aus einer Vielzahl von Substanzen. Unter diesen gibt es weniger flüchtige wie Squalen und Cholesterin, aber auch stärker flüchtige wie die Paraffine und das Pheromon. Alle diese Stoffe sollten sich an einer relativ unpolaren Flüssigphase wie SE 30 (Methyl-Silikongummi) gaschromatographisch auftrennen lassen, da sie ja während der Wasserdampfdestillation über die Dampfphase in die Vorlage übertraten. Die Elution schwerer flüchtiger Bestandteile wurde durch einen Temperaturgradienten mit kontinuierlicher oder stufenweiser Erhöhung der Säulentemperatur beschleunigt.

An die gaschromatographische Trennsäule waren folgende Anforderungen zu stellen:

1. Stabilität der Flüssigphase über einen weiten Temperaturbereich, minimaler Anstieg der Grundlinie;
2. Minimale Schwanzbildung, maximale Trennleistung auch bei hoher Beladung mit Substanzgemisch;
3. Keine Zersetzung der Substanz an aktiven Zentren des Trägermaterials (Silanisierung ist nötig);
4. Die Retentionszeit für die am schwersten flüchtigen Substanzen sollte 100 Minuten nicht überschreiten.

In Vorversuchen schieden viele Flüssigphasen aus, weil sie diese Bedingungen nur teilweise erfüllten. Didecylphthalat z.B. begann über  $100^{\circ}\text{C}$  merklich abzukochen und störte den biologischen Test. Apiezon L trennte zwar sehr gut, hielt die schwer flüchtigen Substanzen aber zu lange zurück. Stahlrohr- und Glasrohrsäulen mit gleicher Füllung unterschieden sich in ihrer Trennleistung nicht und ergaben vergleichbare Gipfelmuster. Eine Zersetzung von Substanzen an der Metallwand der Säule war also nicht zu befürchten. SE 30 war an Trennschärfe dem Apiezon L im Temperaturbereich zwischen  $80$  und  $150^{\circ}\text{C}$  etwas unterlegen, hielt die weniger flüchtigen Anteile aber weniger zurück. Relativ am besten bewährte sich eine mit 5 % SE 30 auf silanisiertem Chromosorb W belegte Glassäule von 6 mm  $\phi$  und 150 cm Länge. Innerhalb von 100 Min. nach Injektion der Probe zeigte der Flammenionisationsdetektor FID<sup>112</sup> etwa 25 Gipfel und Gipfelgruppen an, davon sieben bis zur Grundlinie getrennte Hauptgipfel. Wurde die Temperatur während der Chromatographie stufenweise erhöht, so ließen sich auch einige der Gipfelgruppen (Nebenbestandteile) getrennt darstellen, was bei stufenloser Temperaturprogrammierung nicht gelang. Diese Versuche dienten der Vorbereitung eines wichtigen Experiments: Beim fraktionierten Auffangen u. Auskondensieren des substanzbeladenen Trägergases sollte es sich zeigen, in

welchen Teilen des Chromatogramms die biologisch wirksamen Substanzen liegen. Voraussetzung für eine scharfe Auftrennung war es, eine Verschleppung durch Schwanzbildung zu vermeiden. Ob diese Forderung erfüllt war, ließ sich dadurch kontrollieren, daß jedem Auffangversuch ein Gaschromatogramm parallel lief. Daher wurde der aus der Säule austretende Gasstrom geteilt: 1/10 wurde im FID verbrannt, 9/10 verließen das Gerät unverändert und wurden in eine Kühlfalle geleitet. Um festzustellen, ob überhaupt biologisch wirksame Fraktionen erscheinen, wurde das gesamte eluierte Substanzgemisch in einer mit Glaswolle "gepackten" Kühlfalle aufgefangen. Sowohl beim Kühlen mit flüssigem Stickstoff wie mit Aceton-Trockeneis-Mischung als auch ohne Kühlung war die Gesamtausbeute schlecht reproduzierbar. Sie schwankte zwischen 1 und 10 %. Daß für die hohen Verluste nicht allein eine irreversible Absorption am Trägermaterial der GLC-Säule verantwortlich sein konnte, bewies die Erhöhung der Auffangausbeute auf 30 %, wenn der substanzbeladene Stickstoffstrom in feinen Bläschen einige Millimeter durch ein gekühltes niedrigsiedendes Lösungsmittel durchperlen mußte, das in einem Fläschchen mit 1 - 2 ml Inhalt vorgelegt war. Ein ähnliches Prinzip zum Auffangen gaschromatographisch getrennter Fraktionen in einem vorgelegten Lösungsmittel beschreibt unabhängig NEISWENDER<sup>63)</sup>. Alle anderen Versuche (Erhöhung der Temperatur der Einspritz- und Auslaßsysteme, Ersetzen des Stickstoffs durch das Edelgas Helium) brachten keine weitere Verbesserung der Ausbeute. Da der Wert von 30 % aber reproduzierbar war, schien die Möglichkeit für eine nähere Eingrenzung der Pheromonbestandteile dennoch gegeben.

Mit dem Problem schlechter Auffangausbeuten beschäftigten sich viele Autoren<sup>63, 64)</sup>. R. P. W. SCOTT<sup>65)</sup> untersuchte das Problem systematisch mit Hilfe von Testsubstanzen und fand, daß z.B. die Fettsäuremethylester um so schlechter aufzufangen sind, je geringer ihre Molekulargewicht und je höher ihr Partial-

druck im Trägergas bei gegebener Temperatur ist. Dem Abkühlen der Falle zum Auskondensieren der Substanz ist durch das Einsetzen der Bildung von Aerosolen ("fogging") eine untere Grenze gesetzt. Ein Vorteil des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Auffangsystems (s. Abb. 10) ist, daß das Lösungsmittel nicht mit Silikongummi, sondern nur mit Glas und Metall in Berührung kommt. Das System hat ein sehr geringes Totvolumen. Liegen mehrere solcher Vorlagen hinter einander, so ist die im zweiten Fläschchen nachweisbare Pheromonmenge um eine Größenordnung geringer als im ersten, im dritten ist sie nicht mehr meßbar.

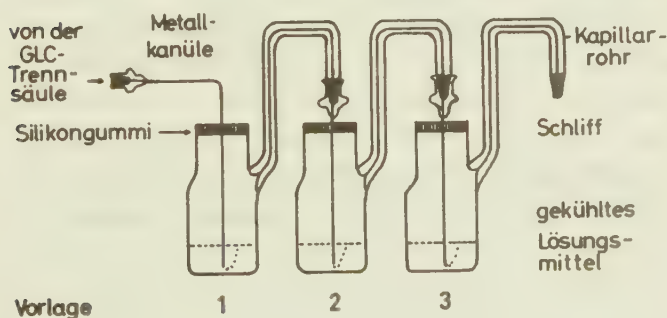


Abb. 10: System zum Auffangen gaschromatographisch getrennter Fraktionen

Damit läßt sich wahrscheinlich machen, daß die ungeklärten Verluste beim Chromatographieren des Substanzgemisches auf dem Trägermaterial der GLC-Säule eintreten. Der Gasstrom, der das Gerät verließ, war also sicher frei von Pheromon. Auch in den Rückständen des Glasinlets im Einspritzblock ließ sich kein Pheromon nachweisen, und die Injektionsspritze war völlig entleert worden. Tatsächlich werden Substanzen an der Säule

absorbiert. Das läßt sich beim Ausheizen der Säule zeigen. Ohne eine Probe injiziert zu haben, kann man bei langsamer Temperaturerhöhung reproduzierbare Schreiberausschläge bei definierten Temperaturen beobachten. Beim mehrfachen Wiederholen des Ausheizens verschwinden diese Ausschläge. Auffangversuche wurden daher stets an ausgeheizten Säulen vorgenommen.

#### Versuch mit einem organischen Trägermaterial

Für die Absorption und mögliche Zersetzung sind die aktiven Zentren des anorganischen Trägers verantwortlich, die nicht völlig mit Flüssigphase bedeckt sind. Nun hat HOLLIS<sup>66)</sup> organische Träger, quervernetzte Polyvinylbenzol-Polymere (sog. "Poropak") entwickelt, die die beschriebenen Nachteile der irreversiblen Absorption nicht haben. Das Belegen mit flüssiger Phase erübrigt sich. Versuche, das Pheromonkonzentrat an Poropak aufzutrennen, schlugen fehl, da erstens die Retentionszeiten des lipophilen Konzentrats an der lipophilen Oberfläche des Trägers auch bei hohen Temperaturen sehr lang sind: Die Gipfel erscheinen verwaschen. Zweitens stören geringe Spuren des sich dauernd nachbildenden monomeren Vinylbenzols den biologischen Test. Bei 200°C Säulentemperatur gewonnene Fraktionen riechen stark. Sie wirken auf Termiten abschreckend.

Im oben angegebenen System von SE 30/N<sub>2</sub> ließen sich beim stufenweisen Erhöhen der Säulentemperatur bis 192°C innerhalb von 54 Minuten 5 200 SE von 20 000 SE wiedergewinnen, während in der zweiten Versuchshälfte von 192 - 262°C nur 890 SE gemessen wurden (Abb. 11).

Beim weiteren Aufteilen in Fraktionen ließen sich 85,3 % der wiedergewonnenen Pheromonmenge den drei Gipfeln bei 191°C (45. - 54. Min.) zuordnen. Die Einzelaktivitäten jedes der drei Gipfel unterschieden sich innerhalb der Fehlerbreite des

biologischen Tests nicht signifikant. Versuche zu ihrer Identifizierung schienen daher lohnend.

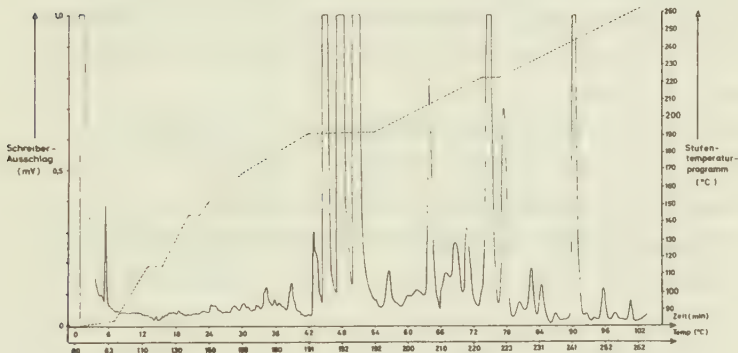


Abb.11: Gaschromatographische Auftrennung von Pheromonkonzentrat an SE 30 mit Hilfe eines Stufentemperatur-Programms (----)

#### Versuche zur Identifizierung der Gipfel bei 190°C

LOVELOCK<sup>67)</sup> beschrieb 1963 ein GLC-System, das er "dual-channel-GLC" nannte. Ein Substanzgemisch wird nach Trennung auf einer GLC-Säule zur Hälfte in einen FID, zur anderen Hälfte in einen Elektroneneinfangdetektor (ECD) geleitet. Während der FID für alle organischen Substanzen in erster Näherung gleich empfindlich ist, weist der ECD nur solche Moleküle nach, die sich durch die  $\beta$ -Strahlung eines Tritium-Präparats ionisieren lassen. Das sind alle aromatischen und heterozyklischen Systeme, Verbindungen mit mehrfach konjugierten Carbonylgruppen, Verbindungen mit Halogensubstituenten usw. Ein Zweikanalschreiber wird gleichzeitig zwei Chromatogramme liefern, die sich je nach Substanzgemisch in der relativen Intensität der einzelnen Gipfel

unterscheiden. Verläßt z. B. ein n-Paraffin die Säule, so wird der FID einen Ionenstrom anzeigen, der ECD nicht. Beide Detektoren werden ansprechen, wenn eine stark ungesättigte oder Carbonylgruppen enthaltende Substanz vorliegt. Dies traf überraschenderweise für die drei herausragenden Gipfel des Pheromonkonzentrats zu: Alle drei Substanzen sind im ECD sehr stark ionisierbar. Sie sind also sicher nicht rein aliphatischer oder alicyclischer Natur.

Einige der Nebenbestandteile, die im Gaschromatogramm zwischen der 1. und 42. Minute liegen, sind im ECD inaktiv und dürften in die aliphatische Reihe einzuordnen sein.

#### Spektroskopische Befunde zur Charakterisierung des Pheromonkonzentrats

##### 3.4.3 UV-Versuche

Auf Grund des Verhaltens im ECD waren chromophore Gruppen zu erwarten, über deren Natur die Absorption im UV-Bereich nähere Aufschlüsse geben konnte.

Tabelle 6: Auffangversuche von Pheromonkonzentrat in spektroskopisch reinem Pentan

| Sub-<br>stanz | Äther-<br>extrakt<br>I, unge-<br>trennt | Fraktions-Nummer |                  |                  |                  |                  |                  |
|---------------|-----------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|               |                                         | 1                | 2                | 3                | 4                | 5                | 0                |
|               |                                         | 0. -15.<br>Min.  | 15. -40.<br>Min. | 40. -60.<br>Min. | 60. -73.<br>Min. | 73. -96.<br>Min. | -15. -0.<br>Min. |
| UV-           | 280                                     |                  |                  | 280              | 282              | 283              |                  |
| Absorp-       | 273                                     | 275              |                  | 273              | 275              | 272              | 274              |
| tion bei      |                                         | 245              |                  |                  |                  |                  | 245              |
| Wellen-       | 235                                     | 235              |                  | 235              | 235              | 235              |                  |
| länge         | 226                                     | 226              |                  | 226              | 225              |                  |                  |
| (nm)          | 221                                     |                  |                  | 221              |                  | 222              |                  |
|               |                                         | 210              |                  |                  |                  |                  | 210              |
|               | 200                                     | 200              | 200              | 200              | 202              | 202              | 200              |
|               | Endab-<br>sorption                      |                  |                  |                  |                  |                  |                  |

Fraktion 0 enthält die Substanzspuren, die bei 80°C von der Säule kamen, bevor Pheromonkonzentrat eingespritzt wurde. Fraktion 3 zeigt die stärksten Absorptionsbanden bei 280, 235, 226 und 221 nm, die für aromatische Systeme charakteristisch sind. Sie liegen deutlich über den Extinktionswerten des Untergrunds und stammen sicher aus dem Ätherextrakt I, in dem sie in einem Parallelversuch ebenfalls nachgewiesen wurden.

#### 3.4.4 IR-Spektroskopie -Versuche

Die Frage nach den funktionellen Gruppen an dem aromatischen System der Hauptbestandteile schien am leichtesten mit Hilfe von IR-Spektren lösbar zu sein. Etwa 1 mg reiner Substanz, in KBr suspendiert und zu einer klaren Scheibe gepreßt, genügen für ein normales Spektrum. Mikroverfahren<sup>68)</sup> ermöglichen es, die Substanzmenge auf 10 µg zu verringern. Berücksichtigt man die Auffangverluste, so sollten 10<sup>6</sup> SE des Konzentrats für ein Spektrum ausreichen. Wie bei den biologischen Auffangversuchen wurden 9/10 des N<sub>2</sub>-Stroms abgezweigt und durch ein Röhrchen geleitet, das 10 mg fein pulverisiertes KBr enthielt. Nach dem Pressen lag eine klare Mikroscheibe von 2 mm Ø vor, deren Absorptionsbanden sich durch Schwächen des Vergleichsstrahls eines lichtstarken Spektrometers gut darstellen ließen. Sie stimmten aber bis in Einzelheiten mit einem Probespektrum von SE 30, der auf der GLC-Säule aufgetragenen Flüssigphase, überein, die zur Trennung diente. Die trockeneisgeköhlte KBr-Schicht hatte also Spuren verdampfenden Silicons zurückgehalten, nicht aber die Pheromonbestandteile.

Diese Ergebnisse ließen es ratsam erscheinen, zunächst die Versuche zur Strukturuntersuchung mit direkten spektroskopischen Methoden wie IR und UV abubrechen, wegen des hohen Substanzbedarfes von einigen mg auch auf die geplanten Kern-

esonanzmessungen zu verzichten und stattdessen die Charakterisierung mit indirekten Verfahren, die den Vorteil des geschlossenen Systems boten, zu versuchen.

Wegen des geringen Substanzbedarfs der analytischen Gaschromatographie schien das Retentionsindexsystem besonders aussichtsreich.

Die Anwendung des Retentionsindexsystems auf das hier vorliegende Problem setzt voraus, daß die Gipfel, die näher charakterisiert werden sollen, sich auf Trennsäulen mit verschiedenen Trennflüssigkeiten bei verschiedenen Temperaturen reproduzierbar darstellen lassen. Diese Voraussetzung war, wie Tabelle 7 zeigt, für mindestens vier verschiedene Säulen erfüllt.

Tabelle 7: Retentionsvolumina der Substanzen unter den drei Hauptgipfeln unter verschiedenen Bedingungen

| Maße der Trennsäulen | Art der Trennflüssigkeit | Menge der Trennflüssigkeit(%) | Temperatur (°C) | Retentionsvolumen der Gipfel                      |     |      |
|----------------------|--------------------------|-------------------------------|-----------------|---------------------------------------------------|-----|------|
|                      |                          |                               |                 | 1<br>(ml), bezogen auf angegebene Temperaturwerte | 2   | 3    |
| 3m,<br>1/8 Zoll      | ApiezonL                 | 20                            | 250             | 252                                               | 301 | 357  |
| 3m,<br>1/8 Zoll      | ApiezonL                 | 20                            | 200             | 678                                               | 825 | 1015 |
| 2,6 m,<br>1/8 Zoll   | ApiezonL                 | 10                            | 200             | 640                                               | 780 | 960  |
| 2,6 m,<br>1/8 Zoll   | ApiezonL                 | 10                            | 150             | 621                                               | 711 | 819  |
| 3,0 m,<br>3/8 Zoll   | SE 30                    | 25                            | 250             | 840                                               | 920 | 1040 |
| 1,5 m,<br>1/8 Zoll   | Neopentylglykol-succinat | 10                            | 90              | 279                                               | 356 | 452  |
| 1,5 m,<br>1/8 Zoll   | Emulphor 0               | 10                            | 200             | 180                                               | 230 | 280  |

### 3.4.5 Das Retentionsindexsystem

Trägt man die Retentionszeiten einer homologen Reihe organischer Verbindungen gegen die Anzahl der enthaltenen C-Atome auf, so erhält man im halblogarithmischen Netz eine Gerade. Fixpunkte dieser Geraden sind die Retentionswerte der n-Paraffine, denen sowohl auf unpolaren wie polaren Säulenfüllungen nach der Definition von KOVÁTS<sup>69)</sup> Indexwerte vom Hundertfachen der jeweiligen C-Zahl zugeordnet werden, z. B. der Indexwert 700 für n-Heptan und 1 900 für n-Nonadecan. Als Retentionsindex  $I_T$  für eine bestimmte Temperatur definiert KOVÁTS<sup>69)</sup> diejenige Zahl, die man erhält, wenn man den Retentionswert einer gegebenen Substanz zwischen den nächstbenachbarten Punkten der Paraffinreihe logarithmisch intrapoliert. Der Retentionsindex ist stark abhängig von der Molekülgröße und den im Molekül anwesenden funktionellen Gruppen. Außerdem besteht noch eine geringe Temperaturabhängigkeit. Bei der Untersuchung einer großen Zahl von Vergleichssubstanzen zeigte es sich, daß die Differenz  $\Delta I_T$  zwischen dem Retentionsindex auf einer unpolaren und einer polaren Säulenfüllung (unter sonst gleichen Bedingungen) für bestimmte funktionelle Gruppen in reproduzierbaren Inkrementen besteht, die sich näherungsweise additiv verhalten und die sich "Haftzonen" zuordnen lassen. Auf Kapillarsäulen sind diese Indexwerte, wie SCHOMBURG<sup>70)</sup> zeigte, auf eine Indexeinheit genau zu reproduzieren. Mit den in dieser Arbeit verwendeten gepackten Säulen ist der Fehler wesentlich größer und kann bei 20 - 30 Indexeinheiten liegen. Die Bestimmung ist aber auch dann noch genau genug, um die Molekülgröße einzugrenzen und - zusammen mit anderen Meßergebnissen - von mehreren möglichen Gruppen bestimmte auszuschließen oder aber wahrscheinlich zu machen.

### Anwendung des Retentionsindexsystems zur Charakterisierung der 3 Hauptgipfel

in Abb. 12 sind die Eichgeraden für die Paraffine  $C_{18}$  bis  $C_{24}$  eingetragen. Die drei in den Hauptgipfeln vorliegenden Substanzen erhalten bei Ablesung der Retentionsvolumina gegen die Eichgeraden die in Tabelle 8 aufgeführten Indices. Danach ergibt sich, daß die gaschromatographisch faßbare Molekülgröße aller drei Substanzen im Bereich um 19 - 20 C-Atome liegt.

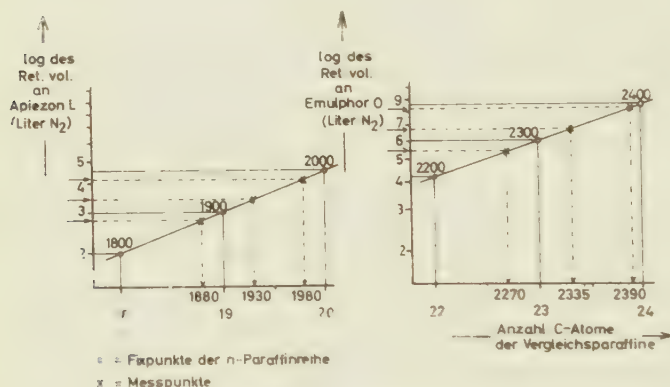


Abb. 12: Graphische Interpolation zur Ermittlung der Retentionsindices der 3 Hauptgipfel

Tabelle 8: Ermittlung der Retentionsinkremente der 3 Hauptgipfel bei 200°C

| Gipfel Nr. | $I_{200}^o$ auf unpolarer Apiezon L-Säule | $I_{200}^o$ auf polarer Emulphor O-Säule | Retentionsinkrement $I_{200}^o$ |
|------------|-------------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------|
| 1          | 1880                                      | 2270                                     | 390                             |
| 2          | 1930                                      | 2335                                     | 405                             |
| 3          | 1980                                      | 2390                                     | 410                             |

Die Retentionsinkremente der gesuchten Verbindungen sind 390, 405 und 410. Die Ähnlichkeit der Zahlenwerte legt nahe, daß es sich um chemisch ähnliche Moleküle handelt. Die Versuchsergebnisse mit dem ECD stützen diese Annahme.

Wie ein Vergleich der gefundenen Werte ( $\Delta I$  um 400 Einheiten) mit den theoretischen Werten in Tab. 9 zeigt, kommen Paraffine nicht in Frage; unwahrscheinlich sind ungesättigte Kohlenwasserstoffe, wahrscheinlich dagegen ist eine Hydroxylgruppe oder, da die Inkremente in 1. Näherung additiv sind, zwei Aldehyd-, Keto- oder Estergruppen.

Tabelle 9: Literaturwerte für Retentionsinkremente nach KAISER<sup>71)</sup>

| Funktionelle Gruppe        | $\Delta I$ -Wert |
|----------------------------|------------------|
| Hydroxylgruppe             | 370-400          |
| Ester (Acetat)             | 212              |
| Aldehyd                    | 221              |
| Keton                      | 231              |
| Vinylgruppe                | 46               |
| Paraffin-Kohlenwasserstoff | 0                |

Eine Entscheidung zwischen Ester-, Aldehyd- und Ketogruppen ist möglich, wenn man das IR-Spektrum des Pheromonkonzentrats hinzuzieht (Abb. 13a), in dem die Banden für die OH-Valenzschwingung (bei  $3\,600\text{ cm}^{-1}$ ) und für die Carbonylgruppen sowohl eines  $\alpha, \beta$ -ungesättigten (um  $1695\text{ cm}^{-1}$ ) oder aromatischen Aldehyds (um  $1705\text{ cm}^{-1}$ ) als auch eines aliphatischen oder aromatischen Ketons (um  $1715$  und  $1690\text{ cm}^{-1}$ ) fehlen. Zu sehen ist dagegen eine starke Absorption bei  $1725\text{ cm}^{-1}$ , die für eine aliphatische Estergruppe ( $1745\text{ cm}^{-1}$ ) zu kurzweilig ist, für einen Arylester aber zutrifft. Für ein Arylsystem sprechen außerdem die Banden bei  $3060$ ,  $1575$  und  $1595\text{ cm}^{-1}$  (Zuordnung nach BELLAMY<sup>72)</sup>). Eine aliphatisch gebundene Aldehydgruppe, die bei  $1730\text{ cm}^{-1}$  absor-

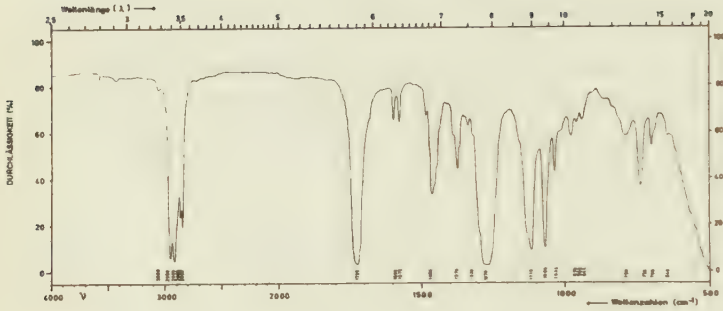
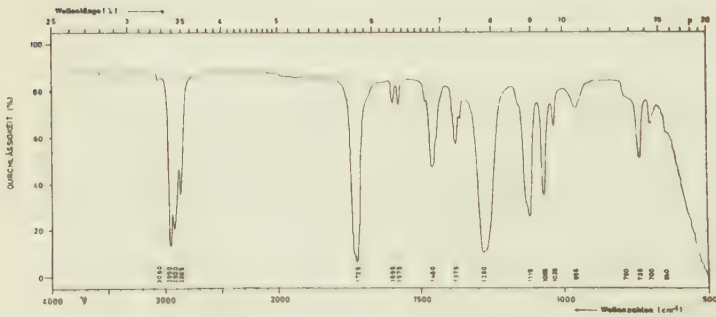


Abb. 13 a: IR-Spektrum des Pheromonkonzentrats.

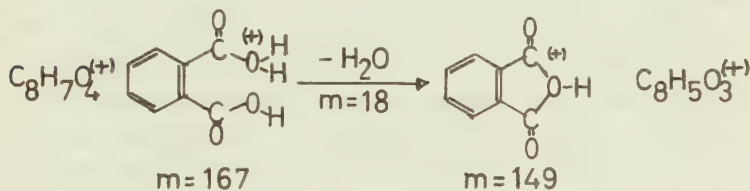
Abb. 13 b: IR-Spektrum von Didecylphthalat.



biert, ist aus chemischen Gründen auszuschließen.

Die gesuchten drei Verbindungen sind also wahrscheinlich aromatische Di-Ester mit einer aliphatischen Seitenkette, die länger als 4  $\text{CH}_2$ -Einheiten ist (Bande um  $735\text{ cm}^{-1}$ ). Die funktionellen Gruppen sollten in Konjugation stehen, um die hohe Elektronenaffinität der Verbindungen zu erklären.

Weitere Aussagen über die chemische Struktur sind aus dem Massenspektrum zu entnehmen. (Vgl. hierzu auch den Abschnitt 3.6.) Molekülbruchstücke mit Masseneinheiten von 149 und 167, deren relative Häufigkeiten sich wie 100:23 verhalten, sind nach BIEMANN<sup>73)</sup> charakteristisch für das Ion  $\text{C}_8\text{H}_7\text{O}_4^{(+)}$ , das sich unter  $\text{H}_2\text{O}$ -Abspaltung zu  $\text{C}_8\text{H}_5\text{O}_3^{(+)}$  stabilisiert:



Der Arylrest trägt also die Di-Estergruppen in ortho-Stellung und stellt die Konjugation der Carbonylgruppen her, die die hohe Elektronenaffinität der Verbindungen erklärt und die sie damit als Ester der Phthalsäure charakterisiert.

Ein Hinweis auf die Empfindlichkeit des ECD-Detektors für Phthalsäureester findet sich auch bei LOVELOCK<sup>67)</sup>.

Beim Vergleich der Abbildungen 13a und 13b fällt auf, daß das IR-Spektrum des Pheromonkonzentrats dem des reinen Phthalsäure-Didecylesters sehr ähnlich ist.

Die Frage, ob dieser Ester tatsächlich einer der Hauptbestandteile des Pheromonkonzentrats ist, läßt sich aus dem Massenspektrum nicht schlüssig beantworten, da ein Molekülion des starken Untergrundes wegen nicht aufzufinden ist. Ein Vergleich

der Retentionsvolumina im Gaschromatogramm mit Phthalsäuredidecylester als Vergleichssubstanz zeigt (Tab. 10), daß der mittlere der gesuchten Gipfel mit Didecylphthalat identisch ist.

Tabelle 10: Retentionsvolumina von Didecylphthalat an SE 30 bei verschiedenen Temperaturen

| Stoff                  | Retentionsvolumen (ml N <sub>2</sub> ) bei |                    |
|------------------------|--------------------------------------------|--------------------|
|                        | 150°C                                      | 200°C <sup>2</sup> |
| Substanzgipfel 2       | 493                                        | 73,5               |
| reines Didecylphthalat | 497                                        | 73,5               |

Didecylphthalat hat die Summenformel C<sub>28</sub>H<sub>46</sub>O<sub>4</sub>. Die Abweichung von der gaschromatographisch ermittelten C-Zahl (rund 20) liegt wohl in der Struktur der Verbindung begründet. Offensichtlich verhält sich der aromatische Ester gaschromatographisch so, als leiste das aromatische System nur einen sehr geringen Beitrag zur Gesamtretention. In den Wert des Retentionsinkrements scheint der Wert für das benzoide System nicht einzugehen.

Gipfel 1 und 3 sind sehr wahrscheinlich ein niederes und höheres Homologes von Phthalsäuredidecylester. Nach KOVÁTS<sup>69)</sup> besteht eine Beziehung zwischen den Siedepunkten  $\delta T_S$  verwandter Verbindungen und ihren Retentionsindices  $\delta I$  auf unpolaren Säulen, die der Gleichung

$$\delta I \approx 5 \delta T_S; \quad \delta T_S = \frac{\delta I}{5}$$

gehorcht. Gipfel 1 und 2, sowie Gipfel 2 und 3 folgen im Abstand von je 50 Indexeinheiten aufeinander, unterscheiden sich also theoretisch in ihren Siedepunkten um  $50 : 5 = 10^\circ\text{C}$ .

Diese Ergebnisse waren überraschend: Phthalsäureester sind synthetische Verbindungen mit vielen Anwendungszwecken. Sie dienen häufig als Weichmacher für Kunststoffe, und können sich während eines längeren Aufarbeitungsganges trotz aller erdenklichen Vorsichtsmaßnahmen anreichern. Um die Frage zu ent-

scheiden, ob diese Verbindungen im ursprünglichen Extrakt enthalten waren, wurden für eine Aufarbeitung Geräte verwendet, die mit heißer Chromschwefelsäure gespült waren. Als Schleppmittel für die Wasserdampfdestillation diente bidestilliertes Wasser. Die Verbindungen der Apparatur saßen "Glas auf Glas" und wurden mit weichmacherfreier Teflonfolie abgedichtet. Schliffe blieben fettfrei. Als Extraktionsmittel diente mehrfach destilliertes Pentan. Auch unter diesen Bedingungen waren gaschromatographisch Phthalate nachweisbar. Beweisend für den Phthalatgehalt des Rohextrakts ist schließlich ein Versuch, in dem dieser ohne vorhergehende Aufarbeitung im Hochvakuum destilliert wurde; auch hierbei wurden Phthalsäureester gefunden. Um die Frage nach der "biologischen Herkunft" der Phthalate zu klären, wurde versucht, in den herauspräparierten Sternaldrüsen ohne weitere Fraktionierung die Inhaltsstoffe unmittelbar nachzuweisen\* (zur Methodik siehe Versuchsteil). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es bisher allerdings nicht gelungen, die Pheromonbestandteile gaschromatographisch reproduzierbar zu erfassen, was angesichts der Kleinheit der Sternaldrüsen verständlich ist.

Als mögliche Quelle der Phthalsäureester kommt schließlich das Verpackungsmaterial in Frage. Tatsächlich waren in den Kunststoff-Flaschen, in denen die Extrakte bei tiefer Temperatur lagerten, dieselben Phthalsäureester enthalten wie im Rohextrakt selbst.

Kunststoffbehälter waren Glasampullen vorgezogen worden, um die sehr wertvollen Extrakte vor der Bruchgefahr des Glases zu bewahren. Zur Anreicherung dieser Fremdstoffe konnte es deshalb kommen, weil sie im biologischen Test aktiv sind. Außerdem lagen sie in vergleichsweise hoher Anfangskonzentration vor.

---

\* Der unmittelbare Nachweis von Insekteninhaltsstoffen in Drüsengewebe gelang SCHILDKNECHT<sup>75)</sup>. Bei seinen Versuchen, z.B. mit Bombardierkäfern, waren die biologischen Voraussetzungen jedoch viel günstiger als bei Termiten, deren Sternaldrüse keine Sekretsammelblase besitzt.

### 3.5 Weitere Aufarbeitung (s. Schema Abschnitt 3.1)

#### 3.5.1 HV-Destillation im Kugelrohr nach WILLSTÄTTER

Der Zweck dieses Aufarbeitungsschrittes war die Abtrennung des Überschusses der Phthalester, die im GLC über  $190^{\circ}\text{C}$  erscheinen. Ihre Siedepunkte liegen bei Normaldruck über  $300^{\circ}\text{C}$ , im Hochvakuum bei  $150^{\circ}\text{C}$ . Die Pheromonbestandteile sollten also aus der Probe herausdestilliert sein, bevor die Phthalsäure-ester übergehen. Nebenbei war eine Abtrennung eines geringen Teils nichtflüchtiger Anteile erwünscht, die bei der Injektion von Proben in den Gaschromatographen im Verdampfer zurückbleiben. Wegen der geringen Substanzmengen waren an die Destillationsgeräte folgende Anforderungen zu stellen:

1. Minimale innere Oberfläche, geringes Totvolumen, keine Schliffverbindungen
2. Leichte Rückgewinnung der getrennten Fraktionen muß möglich sein.

Das Kugelrohr nach WILLSTÄTTER erfüllte diese Bedingungen. Verluste durch unzureichende Kondensation mußten wegen des Wertes der Substanz vermieden werden. An das Kugelrohr üblicher Ausführung (Glasrohr mit Kugeln und einigen Ausbuchtungen (Warzen)) wurden daher noch zwei U-Rohre angeschmolzen, die mit flüssigem  $\text{N}_2$  gekühlt werden konnten. Nach beendeter Destillation genügte es, die getrennten Fraktionen an den mit Pfeilen bezeichneten Stellen (Abb. 14) im Rohr selbst abzuschmelzen und aufzubewahren. Das war ein wichtiger Vorteil, der alle Verluste beim Umfüllen vermeiden half. Versuche mit einer weniger wertvollen Fraktion hatten ergeben, daß sich die Reste des Lösungsmittels Pentan und Reste von Feuchtigkeit im Vakuum der Vorpumpe innerhalb weniger Minuten in das U-Rohr 1 überkondensieren ließen, wenn das 2. U-Rohr und die Warzen ungekühlt blieben. Der Pheromongehalt dieses Kondensats war zu vernachlässigen. In der Kugel blieb nach allmählichem Erhitzen

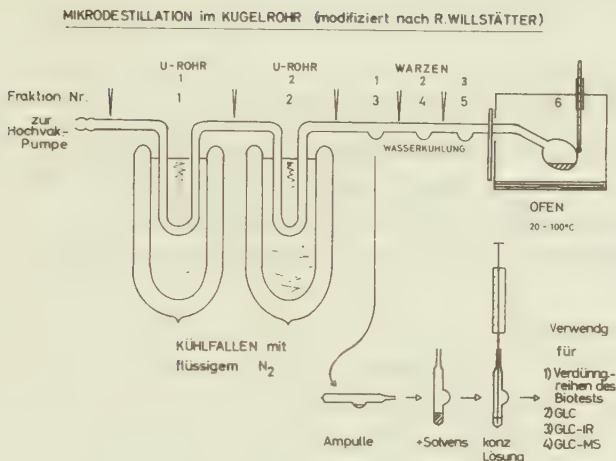


Abb. 14: HV-Destillation im Kugelrohr nach WILLSTÄTTER

auf 96<sup>0</sup> C unter Hochvakuum ( $10^{-3}$  Torr) ein tiefgelber Rückstand von etwa 1 % der ursprünglichen Wirksamkeit. Die Hauptmenge ging als schwach gelbliches Öl bei 84 - 89<sup>0</sup> C in die wassergekühlten Ausbuchtungen über. Sie ließ sich durch Nachschieben des Ofens verflüchtigen und in der darauffolgenden Warze wieder niederschlagen. Im U-Rohr 2 sammelte sich eine geringe Menge eines farblosen Beschlages, der nach dem Auftauen stark nach Capronsäure roch und im biologischen Test eine hohe Wirksamkeit hatte. Sie lag in derselben Größenordnung wie die des esterartig riechenden Kondensats in den Warzen. Die Gesamtausbeute an Spuraktivität betrug nach der HV-Destillation etwa 66 %.

### 3.5.2

#### Versuche zur Identifizierung der destillierten Inhaltsstoffe:

(siehe Aufarbeitungsschema im Abschnitt 3.1)

#### Leichtflüchtige Fraktion 5A:

Diese Fraktion fiel bei jedem Versuch nur in einer Menge von wenigen µg an. Der Geruch erinnerte an Capronsäure. Die Lösung der leichtflüchtigen Fraktion wurde deshalb mit Diazomethanolung umgesetzt und gaschromatographisch untersucht (vgl. Tabelle 11).

Tabelle 11: Carbonsäure-Bestandteile in der leichtflüchtigen Fraktion der HV-Destillation

| Art der Trennsäule | Temperatur der Trennsäule (°C) | Retentionszeit (min) | Trägergasstrom (ml N <sub>2</sub> /min) | Retentionsvolumina der mit CH <sub>2</sub> N <sub>2</sub> in Äther umgesetzten Fraktion (unter der angegebenen Temperatur) (ml) |                |                |                |
|--------------------|--------------------------------|----------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|----------------|----------------|
|                    |                                |                      |                                         | C <sub>5</sub>                                                                                                                  | C <sub>6</sub> | C <sub>7</sub> | C <sub>8</sub> |
|                    |                                |                      |                                         | Carbonsäure                                                                                                                     |                |                |                |
| SE 30              |                                |                      |                                         |                                                                                                                                 |                |                |                |
| 5 %, 1,5 m         | 100,0                          | 1,5                  | 33                                      | 49,5                                                                                                                            |                |                |                |
|                    |                                | 2                    | 33                                      |                                                                                                                                 | 66             |                |                |
|                    |                                | 3                    | 33                                      |                                                                                                                                 |                | 99             |                |
|                    |                                | 5                    | 33                                      |                                                                                                                                 |                |                | 165            |
| Apiezon L          |                                |                      |                                         |                                                                                                                                 |                |                |                |
| 10 %, 3,5 m        | 140,0                          | 3,5                  | 17                                      | —                                                                                                                               | 59,5           | —              |                |
|                    |                                | 6,5                  | 17                                      |                                                                                                                                 |                |                | 110,5          |
| Emulphor O         |                                |                      |                                         |                                                                                                                                 |                |                |                |
| 10 %, 2,0 m        | 100,0                          | 4,5                  | 24                                      | 108                                                                                                                             |                |                |                |
|                    |                                | 8,0                  | 24                                      |                                                                                                                                 | 192            | —              | —              |
| Didecylphthalat    |                                |                      |                                         |                                                                                                                                 |                |                |                |
| 10 %, 3,3 m        | 100,0                          | 5                    | 18                                      | 90                                                                                                                              |                |                |                |
|                    |                                | 14,5                 | 18                                      |                                                                                                                                 | 261            | —              | —              |

Die angegebenen Retentionsvolumina beziehen sich auf die gas-chromatographischen Gipfel, die nach Umsetzung der ätherischen Lösung von Fraktion 5A der HV-Destillation erhalten wurden. Diese Volumina stimmen innerhalb der Meßgenauigkeit mit den Werten der entsprechenden, synthetisch gewonnenen Methyl-ester der n-Carbonsäuren überein.

Beweisend für Capronsäure ist die Identität der unter dem Symbol  $C_6$  angegebenen Retentionsvolumina auf 4 verschiedenen Säulen. Gesichert ist auch die Übereinstimmung für n-Valeriansäure (Symbol  $C_5$ ) auf 3 verschiedenen Säulen, während das Vorkommen von n-Heptan - und n-Octansäure nur als wahrscheinlich, nicht jedoch als sicher gelten kann. Striche in den Spalten unter den Symbolen bedeuten, daß der Gipfel sich nicht signifikant vom Untergrund hervorhob.

Um auszuschließen, daß die Carbonsäuren während der Aufarbeitung, z. B. durch Esterhydrolyse während der Wasserdampfdestillation, entstanden sind, wurde ein Rest des ursprünglichen Termitenrohextrakts bei Normaldruck sublimiert: Das Temperaturgefälle zwischen dem auf  $50^{\circ}\text{C}$  erwärmten Boden des Sublimationsrohres und dem auf  $-190^{\circ}\text{C}$  gehaltenen Kühlfinger reichte aus, um einen dünnen Beschlag an Restfeuchtigkeit über-sublimieren zu lassen. Dieser Beschlag roch deutlich nach Capronsäure, verlor aber diese Geruchskomponente sofort nach Umsetzung mit Diazomethan. Spuren des Capronsäure-methylesters ließen sich gaschromatographisch nachweisen und stimmten im Retentionsvolumen mit dem Präparat aus dem Aufarbeitungsweg genau überein. Damit ist gesichert, daß Capronsäure ein Bestandteil des Termitenrohextraktes ist. Wahrscheinlich liegen auch die niederen und höheren Homologen n-Carbonsäuren in Spuren vor.

Besonders bemerkenswert ist, daß Capronsäure eine hohe Spurpheromonaktivität besitzt (1 mg entspricht 50 000 SE). Es ist daher anzunehmen, daß diese Säure ein integrierender Bestand-

teil des Pheromons ist. Wie später gezeigt wird (Abschnitt 3.8.1) ist der Methylester weit weniger wirksam.

### Versuche mit den weniger flüchtigen Fraktionen der HV-Destillation

Das IR-Spektrum (Abb. 15) zeigt deutlich die Veränderung, die das Pheromonzentrat (Abb. 13a) während der HV-Destillation erfahren hat.

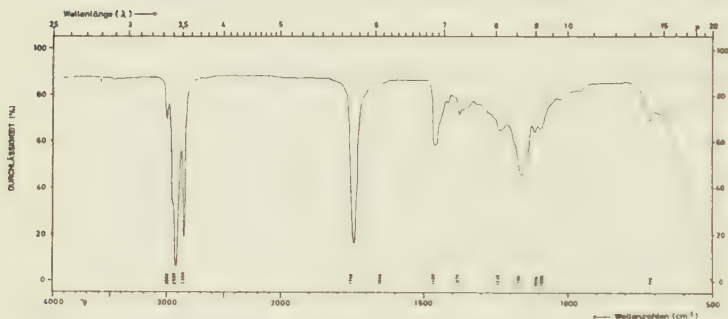


Abb. 15: IR-Spektrum der weniger flüchtigen Fraktion 5B

1. Das Spektrum ist bandenärmer
2. Die Banden bei  $3050$ ,  $1595$  und  $1575\text{ cm}^{-1}$  sind verschwunden.  
Das Arylsystem der Phthalsäureester ist also weitgehend abgetrennt (Restkonzentration geringer als 10 %)
3. Die ausgeprägte Bande bei  $1725\text{ cm}^{-1}$  ist längerwellig verschoben und liegt bei  $1745\text{ cm}^{-1}$ . Dieser Wert entspricht einer aliphatischen Estergruppe.
4. Neu ist die Bande bei  $3000\text{ cm}^{-1}$  (Gruppe  $\text{>C}=\text{C}-\text{H}$ ) und die

Schulter um  $1650\text{ cm}^{-1}$ , die auf eine nicht aromatische C=C-Doppelbindung hinweisen.

### 3.5.3 Chemische Versuche

Die gelbliche Substanz hatte ölige Konsistenz und war beim Anreiben mit Lösungsmitteln nicht zu kristallisieren. Sie roch esterartig. Um diesen Hinweis chemisch zu untermauern, wurde die Substanz verseift und das Reaktionsgemisch dem biologischen Test unterworfen. Das Ergebnis war bei saurer und alkalischer Behandlung verschieden : Beim Umsetzen mit einem Überschuß konzentrierter  $\text{NaOCH}_3$ -Lösung in  $\text{CH}_3\text{OH}$  fiel die Spurwirkung nach 30 Minuten auf 1/5 der ursprünglichen ab, um dann für einige Stunden konstant zu bleiben. Bei saurer Behandlung blieb die Aktivität mehrere Stunden unverändert und stieg dann auf Werte an, die erheblich höher lagen als der ursprüngliche. Dieser Anstieg läßt sich aber als Artefakt erklären. Methanol setzt sich mit  $\text{HClO}_4$  und in stärkerem Maße mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und  $\text{H}_3\text{PO}_4$  zu spurbildenden Agentien um, wenn man die Lösung einige Stunden stehen läßt, ohne etwas vom HV-Destillat, Fraktion 5 B, beizumischen. Der entsprechende Blindversuch fiel bei alkalischen Ansätzen negativ aus.

Nach diesen Versuchen ist wahrscheinlich, daß die bei der alkalischen Verseifung entstehenden Reaktionsprodukte ebenfalls biologisch aktiv sind.

### 3.5.4

#### Gaschromatographische Untersuchungen der HV-Destillate

Während sich die flüchtige Fraktion 5 A vor der Methylierung auf verschiedenen Säulen schlecht auftrennen ließ und undeutliche Gipfel zeigte, ließ sich der Inhalt der weniger flüchtigen Fraktion 5 B gaschromatographisch sehr gut charakterisieren.

Unterschiede in der qualitativen Zusammensetzung wurden nicht beobachtet. Sehr deutlich trat aber der qualitative Unterschied zu dem Gaschromatogramm des nicht destillierten Pheromonkonzentrats (Abb. 11) hervor. Das herausragende Muster der 3 Hauptgipfel war verschwunden, die Zahl der Bestandteile von 25 Gipfeln auf 19 vermindert, von denen einer mit der Retentionszeit von 23 Minuten besonders hervorragte (s. Abb. 17).

### Gaschromatographische Versuche mit den weniger flüchtigen Fraktionen 5B der HV-Destillation

#### Identifizierung einiger ungeradzahliger Kohlenwasserstoffe durch GLC

Vergleichende Messungen mit n-Paraffinen ergaben, daß die schwerer flüchtige Fraktion noch überschüssige KW enthielt, die durch ihre Retentionsvolumina auf SE 30 wie folgt charakterisiert wurden:

Tabelle 12:

| Retentionsvolumen<br>(bei 200°C auf 5 %<br>SE 30, Säulenlänge<br>1,5 m )<br>(ml N <sub>2</sub> ) | Zuordnung                                        |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| 560                                                                                              | n-Heneicosan,<br>C <sub>21</sub> H <sub>44</sub> |
| 1190                                                                                             | n-Tricosan<br>C <sub>23</sub> H <sub>48</sub>    |

Das Testgemisch der Paraffine enthielt nur die Glieder der geradzahligen n-Paraffine. Die neu hinzukommenden Gipfel im GLC ließen sich innerhalb der Meßgenauigkeit den angegebenen ungeradzahligen Paraffinen zuordnen. Sie lagen im halblogarithmischen Netz in der Mitte zwischen den Punkten, die den gerad-

zahligen Gliedern der n-Paraffinreihe entsprachen. Ein 2. Versuch auf einer polaren Carbowax 20M-Säule bestätigt dieses Ergebnis und zeigt, daß außerdem noch n-Pentacosan,  $C_{25}H_{52}$ , im Gemisch enthalten ist. Einige kleinere Gipfel, deren zugehörige Meßwerte nicht genau zwischen den Punkten der n-Paraffine lagen, könnten der iso-Reihe angehören (s. MS - Versuche Kap. 3, 7). Im biologischen Test sind diese Paraffine inaktiv. Aus mehreren Gründen läßt sich ausschließen, daß die höheren KW in den weniger flüchtigen Fraktionen der HV-Destillation Kunstprodukte sind:

1. Das Extraktionsmittel n-Pentan wurde hoch gereinigt und war gaschromatographisch einheitlich.
2. Hätte es dennoch Spuren höherer KW enthalten, so müßten sich während der Aufarbeitung die geradzahligen KW im selben Verhältnis angereichert haben wie die ungeradzahligen. Die ungeradzahligen KW waren aber im Überschuß vorhanden, selbst in einer Probe, die durch unmittelbare HV-Destillation des Rohextrakts gewonnen war und die nicht mit Pentan in Berührung kam.
3. Den möglichen Einwand, die höheren KW könnten von Verunreinigungen im ursprünglich für die Rohextraktion verwendeten Äther herrühren, widerlegen schließlich die Befunde von LOULOUES et al.<sup>96)</sup>, die einen Überschuß ungeradzahliger KW mit 16 - 35 C-Atomen in anderen Insekten, z. B. Musca und Calliphora feststellten. CAVILL<sup>97)</sup> beschreibt das Vorkommen ungeradzahliger und ungesättigter KW mit 15 - 17 C-Atomen im Sekret der Dufour-Drüse von Ameisen der Art *Myrmecia gulosa* (F.). Auch in Kartoffelkäferlarven (von ARDENNE<sup>98)</sup>) und in der Hämolymphe von Küchenschaben (GILBY<sup>99)</sup>), sowie im Bienenwachs und in Exkrementen von pflanzenfressenden Säugetieren (ORÓ<sup>87)</sup>) kommen solche KW vor.

3.5.5 Abtrennung des Paraffinüberschusses durch Harnstoff-  
Trennung  
(Aufarbeitungsschritt 6, siehe Schema Abschnitt 3.1)

Eine Erhöhung der spezifischen Pheromonwirkung (bezogen auf mg Substanz) war zu erwarten, wenn die Abtrennung der inaktiven Paraffine gelang. Nach FIESER<sup>76)</sup> kann man Paraffine und Verbindungen mit langer Paraffinseitenkette über 8C-Atomen in das Gitter des kristallisierenden Harnstoffs desto besser einbauen, je länger die Paraffinketten sind. Die entstandenen Einschlußverbindungen werden durch Herauslösen der eingebauten Substanz mit Diäthyläther oder durch Auflösen des Harnstoffgitters mit Wasser unter mildesten Bedingungen wieder zerlegt.

Eine chemische Veränderung biologisch wichtiger Bestandteile ist also ausgeschlossen. Verzweigte und ungesättigte Verbindungen passen nicht ins Harnstoffgitter und werden nicht eingeschlossen. Die Auswertung der Versuche ergab, daß sich die spezifische Aktivität steigern ließ. 1/3 der Substanz war in den Harnstoff eingebaut, aber nur etwa 1 % der Spurwirkung.

Für die Struktur der spuraktiven Substanzen lassen sich daraus folgende Grenzbedingungen ableiten:

1. Pheromonwirksame Stoffe können nur verzweigte Moleküle oder unverzweigte mit einer Kettenlänge unter 8 C-Atomen sein.
2. Möglich sind auch unverzweigte Moleküle mit mehr als 8 C-Atomen, wenn sie Doppelbindungen, Ringe oder sperrige funktionelle Gruppen nicht an den Enden, sondern etwa in der Mitte der C-Kette besitzen, z.B. die Estergruppe.

Die folgenden Versuche wurden, wenn nicht anders angegeben, mit der hochaktiven Fraktion 6A der Harnstofftrennung ausgeführt.

### 3.5.6 Anreicherungs-faktoren in den Aufarbeitungsschritten 5 und 6

Der Zweck der Aufarbeitungsschritte 5 und 6 bestand hauptsächlich darin, die Fraktionen in eine für die schließliche Identifizierung geeignete Form zu überführen. Die Anreicherungs-faktoren in den Schritten 5 und 6 waren mit 10 (für Fraktion 5A) und 2 (für Fraktion 6A) gegenüber der Anreicherung um den Faktor 460 in Schritt 2 bis 4 relativ gering.

### 3.5.7 Auffangversuch und biologische Auswertung der über eine Harnstofftrennung angereicherten Fraktion 6A

Dieses Experiment diente einer neuen Festlegung der biologisch wichtigen Gipfel im GLC. Eine Beziehung zwischen Gipfelmuster im GLC (Abb. 16) und biologischer Auswertung gibt Tabelle 12.

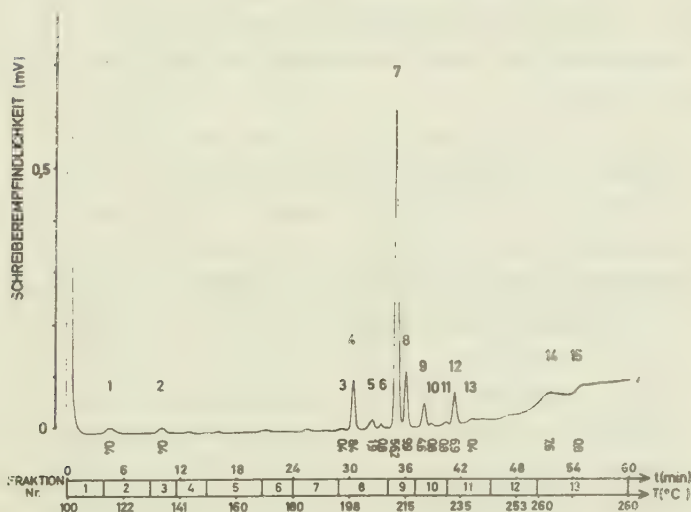


Abb. 16: Lage der Gipfel mit biologischer Aktivität im Gas-chromatogramm

Tabelle 12

| Fraktions-<br>Nr. des<br>GLC | enthält<br>Eluat von<br>Gipfel Nr. | auffallender<br>Geruch | biologische<br>Wirkung |
|------------------------------|------------------------------------|------------------------|------------------------|
| 1                            | -                                  | -                      | 10                     |
| 2                            | 1                                  | +                      | 150                    |
| 3                            | 2                                  | +                      | 40                     |
| 4                            | -                                  | +                      | 15                     |
| 5                            | -                                  | +                      | 20                     |
| 6                            | -                                  | -                      | 10                     |
| 7                            | -                                  | -                      | 15                     |
| 8                            | 3, 4, 5, 6                         | -                      | 10                     |
| 9                            | 7, 8                               | -                      | 10                     |
| 10                           | 9, 10, 11                          | -                      | 10                     |
| 11                           | 12, 13                             | +                      | 50                     |
| 12                           | -                                  | -                      | 15                     |
| 13                           | 14, 15                             | -                      | 20                     |

Summe 370

Die eingesetzte Pheromonmenge betrug 1 200 SE.  
Wiedergewonnen wurden 370 SE = 31 %. Davon ent-  
fallen je Fraktion auf den Untergrund 10 SE, d. h.  
insgesamt 130 SE. Der wirkliche Pheromongehalt  
des Eluats ist also nur 240 SE entsprechend 20 % der  
eingesetzten Menge.

Aus diesem Versuch ist zu schließen, daß die Gipfel 1, 2, 12  
und 13 besonders wichtig sind.

### 3. 6 Massenspektrometrische Versuche zur Identifizierung einiger Pheromonbestandteile

#### Versuche mit Pheromonkonzentrat

Für den Nachweis gaschromatographisch getrennter Fraktionen  
im Massenspektrometer (MS) gibt es mehrere Methoden. Ent-  
weder verdampft man die Substanz in einem evakuierten Be-  
hälter durch langsames Erwärmen und läßt den Dampfstrahl

durch eine Düse in die Ionenquelle austreten. Dieses Verfahren hat den Vorteil, daß die Substanz dosierbar ist. Der nicht verbrauchte Rest einer wertvollen Substanz läßt sich durch Kühlen zurückgewinnen. Man kann aber die getrennten Fraktionen auch in einen Goldtiegel einfüllen und durch eine Vakuumschleuse unmittelbar in die Ionenquelle bringen. Dort wird sie je nach Siedepunkt im Hochvakuum schnell verdampfen. Auch Lösungsmittel enthaltende Fraktionen sind nach dieser Methode auszuwerten, wenn sich die Flüchtigkeiten von Solvens und gelöster Substanz stark unterscheiden. Von Vorteil ist dabei der geringe Substanzbedarf.

Mehrere Versuchsserien<sup>3\*</sup>, die nach der 2. Methode durchgeführt wurden, ergaben, daß sich nur Phthalsäureester in genügender Menge auffangen und nachweisen ließen. Die Massenspektren von den restlichen Fraktionen zeigten nur geringe Spuren von Substanzen und waren nicht zu diskutieren. Besondere Schwierigkeiten bereitete das selektive Abdampfen des Lösungsmittels Pentan. War das Hochvakuum im Gerät nach Einführung der Probe wieder auf dem Normwert angelangt, so war die gelöste Substanz trotz Kühlung des Einführungssystems mit flüssigem N<sub>2</sub> schon weitgehend verdampft. Mengen im Bereich weniger Mikrogramm wären mit dem hochempfindlichen Gerät sicher nachzuweisen gewesen. Ein Blindversuch mit je 5 µg Limonen und n-Octadecan ergab ausgezeichnete Massenspektren. Damit war der Beweis erbracht, daß die Substanz entweder beim Auffangen der Fraktionen oder beim Einführen ins Hochvakuum verloren gingen. Wurden 50 µg, also die 10-fache Menge der nötigen Substanz in den Gaschromatographen injiziert und zuerst unter Kühlung, in einem 2. Versuch ohne Kühlung auffangen, so waren im MS nur Spuren von Limonen und n-Octa

<sup>3\*</sup> durchgeführt mit Dr. Schäfer, MPI für Biochemie, München.  
Ich danke Dr. Schäfer für sein Entgegenkommen.

decan nachweisbar, die nicht ausgereicht hätten, um eine unbekannte Substanz zu messen.

Ähnlich schlechte Erfahrungen mit dieser Methode sind in der Literatur beschrieben. Nach SCHOMBURG<sup>79)</sup> und McFADDEN<sup>80)</sup> sind mit der "diskontinuierlichen Kombination" von GLC und MS bei kleinen Substanzmengen, wie sie bei der Isolierung von Naturstoffen oft vorliegen, im allgemeinen keine Ergebnisse zu erzielen. Dagegen hat sich in jüngster Zeit die sog. "kontinuierliche Kombination" bewährt ("Tandem GLC-MS").

Mit dieser Methode sind die folgenden Ergebnisse gewonnen (Zusammenfassung Tabelle 13).

### 3.7 Versuche mit dem gekoppelten GLC-MS-System

Bei der kontinuierlichen Kopplung von GLC und MS wird der substanzhaltige Gasstrom in die Ionenquelle des MS geleitet, das als spezifischer Detektor für ionisierbare organische Verbindungen wirkt. Der stofftrennende Teil, das GLC-System, ist auf diese Weise mit einem strukturerkennenden, dem MS, verbunden zu einem neuen analytischen Prinzip, das von GOHLKE 1959 eingeführt und von verschiedenen Autoren<sup>79-87)</sup> zu einer sehr leistungsfähigen Methode ausgebaut wurde. Damit sind die folgenden, in Tabelle 13 zusammengefaßten Ergebnisse<sup>\*</sup> gewonnen.

In den Geräten mit Doppelionenquelle werden simultan ein Gaschromatogramm und eine Serie von Massenspektren gewonnen. Dabei zeigt sich, daß manche Gipfel, die im GLC einheitlich aussehen, mehrere Substanzen enthalten, die sich aber massenspektrometrisch unterscheiden lassen. Auffangprobleme sind

<sup>\*</sup> Ich danke der Firma COLORA Messtechnik GmbH., Lorch, für mehrere Messungen mit dem Gerät LKB 9 000, den Herren Professor Dr. RYHAGE, Stockholm, Dr. FEHLHABER, Bonn, und Dipl. Chem. KÖNIG, Tübingen, für wertvolle Diskussionen.

damit hinfällig. Das erforderliche Hochvakuum im MS läßt sich nur bei Verwendung einer Kapillarsäule halten, an der sich nur kleine Substanzmengen trennen lassen. Nebenbestandteile und Spuren können daher trotz der hohen Empfindlichkeit der Anordnung unterhalb der Nachweisgrenze von 1 µg Substanz liegen. Bei Verwendung einer höher belastbaren gepackten Trennsäule wird ein Separator<sup>86)</sup> notwendig, der überschüssiges Helium unter möglichst geringen Verlusten der gesuchten organischen Substanzen abzutrennen gestattet. Für die Messungen dieser Arbeit wurde der Separator nach BECKER-RYHAGE<sup>82)</sup> verwendet. Schwierigkeiten traten bei der Auswertung kleiner Gipfel auf, da die von der Säule abdampfende Trennflüssigkeit ein Untergrundspektrum ergibt, daß sich dem MS der gesuchten Substanz überlagert. Dieses Problem ließ sich teilweise dadurch lösen, daß an verschiedenen Stellen des Gaschromatogramms, an denen keine Gipfel lagen, Massenspektren des Untergrunds aufgenommen wurden. Die Werte für den Untergrund wurden nachträglich von den überlagerten Spektren subtrahiert. Bei den Gipfeln 2, 3, 13, 16 und 17 der Abbildung 17, die von der Fraktion 6A stammen, war eine Auswertung nicht möglich.

Die Identifizierung der gewonnenen Massenspektren (Abb. 18.1 bis 18.8), entsprechend Gipfelnummer 7, 8, 11 und 14, wurde durch die regelmäßige Folge von Massenpeaks mit Abstand von je 14 Masseneinheiten ( $\hat{=}$  1 CH<sub>2</sub>-Gruppe) erleichtert. Der Typ der verzweigten KW (Verbindung 9, 10 und 12, siehe Tabelle 13) ist bei SPITELLER<sup>74)</sup> beschrieben. Die Verbindungen Cholesterin und Squalen (Gipfelnummer 18 und 19) wurden durch Vergleich ihrer Massenspektren mit denjenigen der reinen Verbindungen sicher identifiziert.

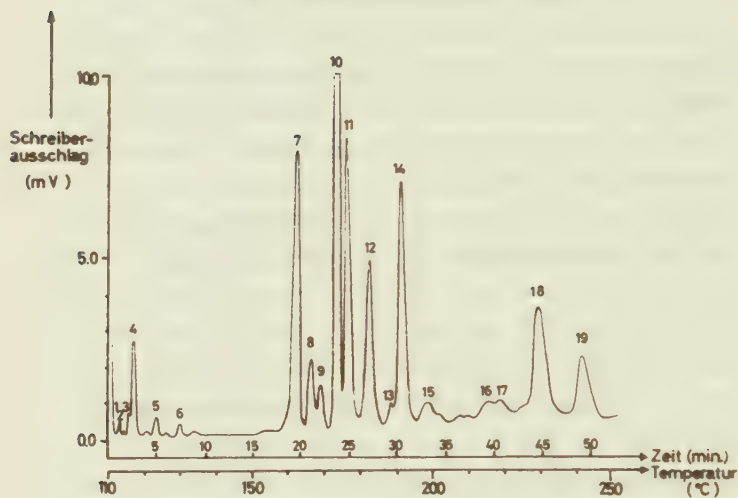


Abb. 17: Gaschromatogramm der simultanen GLC-MS-Kombination von Fraktion 6A

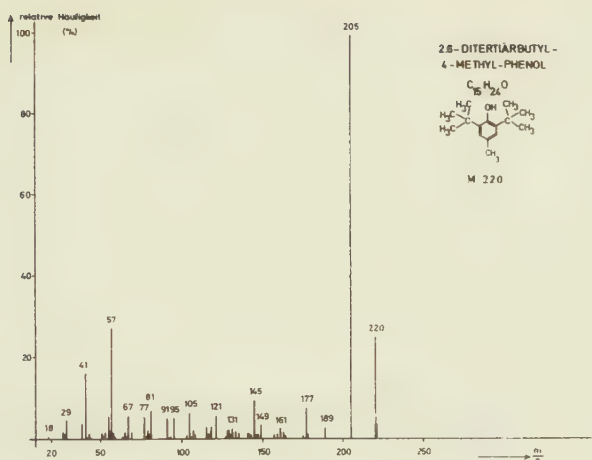


Abb. 18.1: MS von 2,6-Ditertiärbutyl-4-methyl-Phenol

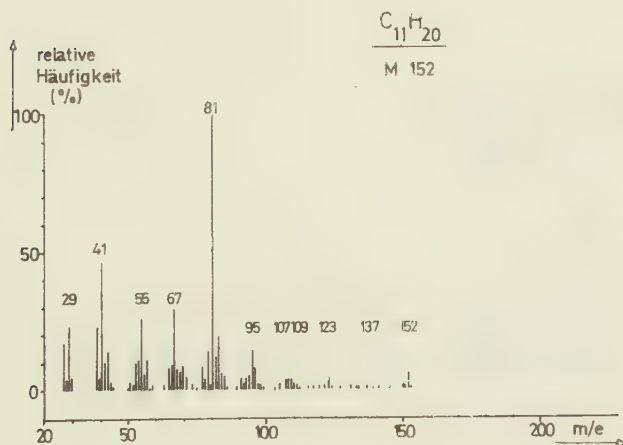


Abb. 18.2: MS von GLC-Gipfel Nr. 4, M 152

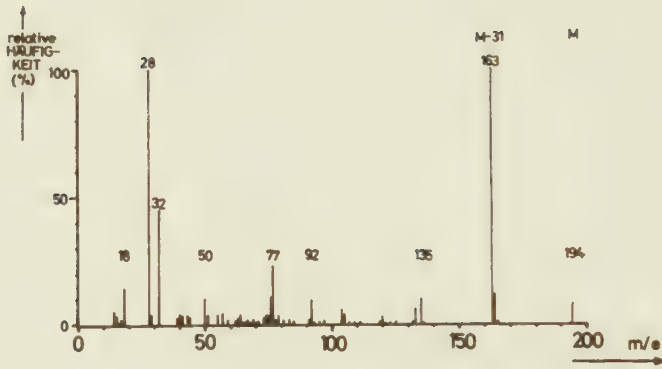


Abb.18.3: MS von GLC - Gipfel Nr.5, M 194

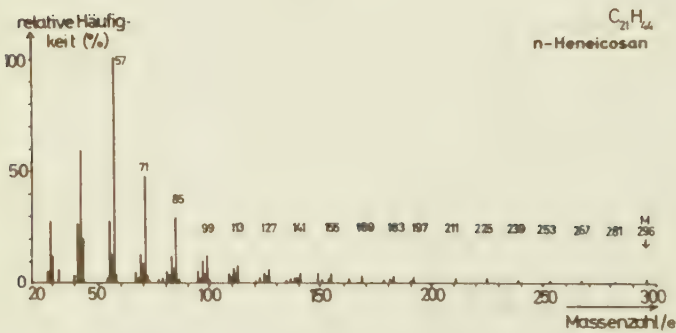


Abb.18.4: MS von GLC - Gipfel Nr.7, n-Heneicosan

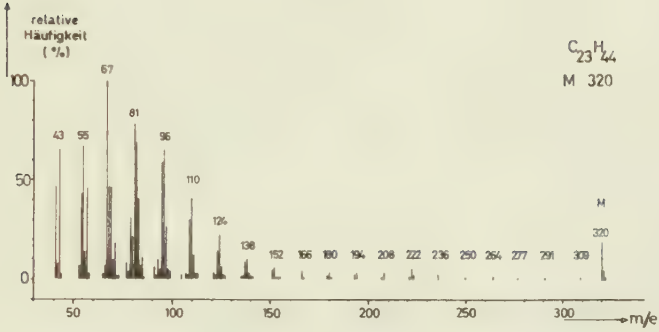


Abb. 18.5: MS von GLC-Gipfel Nr.10, M 320

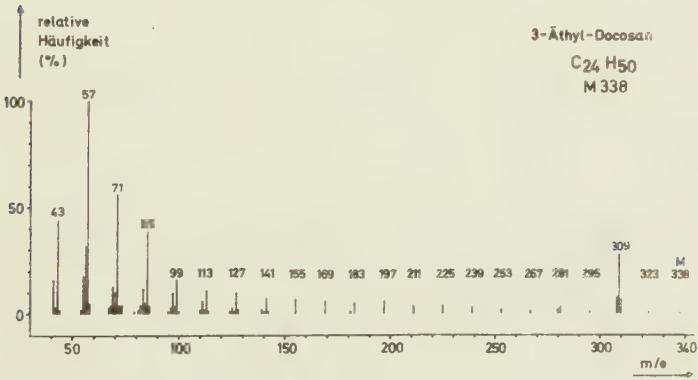


Abb. 18.6: MS von GLC-Gipfel Nr.12, M 338

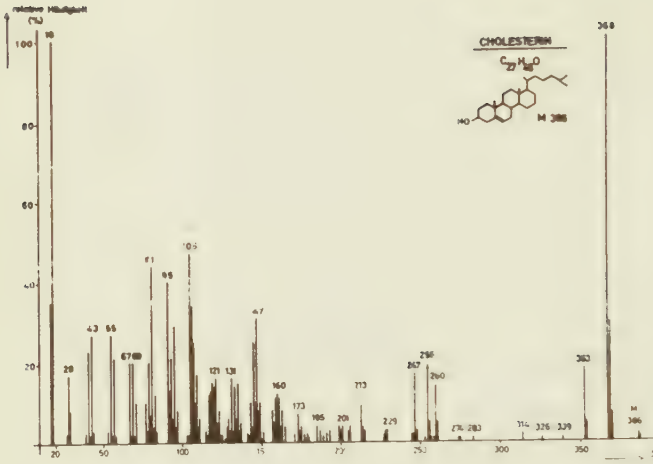


Abb. 18.7 · MS von GLC-Gipfel Nr.18, Cholesterin

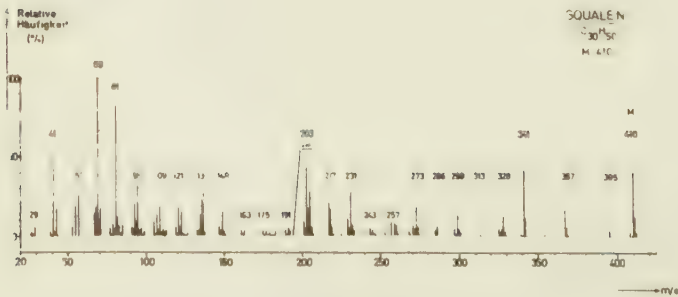


Abb.18. 8 : MS von GLC -Gipfel Nr. 19, Squalen

**Tabelle 13:** Inhaltsstoffe der Fraktion 6A der HV-Destillation  
(getrennt an einer gepackten Säule, nachgewiesen mit I.K.B. 3 000-Massenspektrometrie)

| Gipfel-Nr.<br>im Gaschromatogramm | Molekülgipfel<br>(Masseneinheiten) | Charakteristische Molekülbruchstücke bei 70 eV<br>Elektronenenergie | Molekularformel   | Name der identifizierten Verbindung oder Molekültyp            |
|-----------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|-------------------|----------------------------------------------------------------|
| 1                                 | 220                                | 57, 105, 145, 177, 189, 205                                         | $C_{15}H_{24}O$   | 2, 6-Diteritär-butyl-4-methyl-phenol                           |
| 2                                 |                                    | nicht auswertbar                                                    |                   | -                                                              |
| 3                                 |                                    | nicht auswertbar                                                    |                   | -                                                              |
| 4*                                | 152                                | 41, 55, 67, 81, 95                                                  | $C_{11}H_{20}$    | nicht aromatischer KW mit 2 C=C, 1 C≡C oder alicyclischem Ring |
| 5*                                | 194                                | 77, 135, 163                                                        | $C_{10}H_{10}O_4$ | aromatischer Ester                                             |
| 6*                                | 238                                | 43, 55, 69, 81, 95, 179, 197, 220                                   |                   | ungesättigter aliphatischer Körper mit O-Funktion              |
| 7                                 | 296                                | 43, 57, 71, 85                                                      | $n-C_{21}H_{44}$  | n-Heneicosan                                                   |
| 8                                 | 310                                | 43, 57, 71, 85                                                      | $n-C_{22}H_{46}$  | n-Docosan                                                      |
| 9                                 | 310                                | 43, 57, 71, 85, 281                                                 | $C_{22}H_{46}$    | verzweigter, gesättigter KW, 3-Äthyl-Eicosan                   |
| 10*                               | 320                                | 43, 55, 71, 85, 96                                                  | $C_{23}H_{44}$    | ungesättigter KW mit 2 C=C, 1 C≡C oder alicyclischem Ring      |

Tabelle 13: Fortsetzung

| Gipfel-Nr.<br>im Gaschromatogramm | Molekulgipfel<br>(Masseneinheiten) | Charakteristische Molekülbruchstücke bei 70 eV<br>Elektronenenergie | Molekularformel                    | Name der identifizierten<br>Verbindung oder Molekül-<br>typ |
|-----------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| 11                                | 324                                | 43, 57, 71, 85, 99                                                  | n-C <sub>23</sub> H <sub>48</sub>  | n-Tricosan                                                  |
| 12*                               | 338                                | 43, 57, 71, 85, 309                                                 | C <sub>24</sub> H <sub>50</sub>    | verzweigter, gesättigter<br>KW, 3-Äthyl-Docosan             |
| 13*                               |                                    | nicht auswertbar                                                    |                                    | -                                                           |
| 14*                               | 352                                | 43, 57, 71, 85, 99                                                  | n-C <sub>25</sub> H <sub>52</sub>  | n-Pentacosan                                                |
| 15                                | 366                                | 43, 57, 71, 85, 337                                                 | C <sub>26</sub> H <sub>54</sub> ** | verzweigter, gesättigter<br>KW, 3-Äthyl-Tetracosan          |
| 16                                |                                    | nicht auswertbar                                                    |                                    | -                                                           |
| 17                                |                                    | nicht auswertbar                                                    |                                    | -                                                           |
| 18                                | 386                                | 81, 105, 147, 255, 368                                              | C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O  | Cholesterin                                                 |
| 19                                | 410                                | 41, 69, 81, 95, 137                                                 | C <sub>30</sub> H <sub>50</sub>    | Squalen                                                     |

\* stark überlagert von Molekülbruchstücken 149, 167 (Weichmacher)

\*\* MG unsicher, Molekulation fehlt.

Bei einigen der nicht auswertbaren Gipfel ergab die Analyse mit Hilfe einer Kapillarsäule (150 m Länge, unpolare Flüssigphase), die mit einem Atlas-CH4-Massenspektrometer gekoppelt war, daß es sich wahrscheinlich um Dodecan (M 170), Tetradecan (M 198), Naphthalin (M 128), Methylnaphthalin (M 142) und höher kondensierte Aromaten wie Acenaphthen (M 154) handelt.

Tabelle 14: Spurwirksamkeit einiger Substanzen auf Termiten  
der Art *Zootermopsis nevadensis* (Spureinheiten/mg)

| Nr.                                                   | Substanz                            | Rein-<br>heits-<br>grad* | (SE/mg) | Substanz                      | Rein-<br>heits-<br>grad* | (SE/mg) |
|-------------------------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|---------|-------------------------------|--------------------------|---------|
| <u>n-Kohlenwas-<br/>serstoffe</u>                     |                                     |                          |         | <u>Carbonsäuren</u>           |                          |         |
|                                                       | Paraffinöl                          | 5                        | 0,05    | Abietinsäure<br>(Nr. 24)      | 2                        | 0,3     |
|                                                       | n-Octadecan                         | 5                        | 0,5     | Phthalsäure                   | 3                        | 7,5     |
|                                                       | n-Eicosan                           | 5                        | 0       | p-Hydroxy-<br>benzoesäure     | 4                        | 8       |
|                                                       | n-Docosan                           | 5                        | 0       | Propionsäure                  | 3                        | 700     |
| <u>Terpen-KW</u>                                      |                                     |                          |         | i-Buttersäure                 | 3                        | 1000    |
| 1                                                     | (+)-Limonen                         | 3                        | 2,5     | n-Caprinsäure                 | 4                        | 50000   |
| 2                                                     | (-)-Limonen                         | 3                        | 3       | n-Caprylsäure                 | 3                        | 2500    |
| 3                                                     | Squalan                             | 2                        | 2,5     | n-Caprinsäure                 | 4                        | 10      |
| 4                                                     | Squalen                             | 2                        | 3       | n-Laurinsäure                 | 4                        | 4       |
| 5                                                     | (+)-Camphen                         | 1                        | 10      | <u>Carbonsäure-<br/>ester</u> |                          |         |
| 6                                                     | Terpentinöl                         | 2                        | 20      | Triacetin                     | 3                        | 0,6     |
| 7                                                     | Dipenten                            | 1                        | 40      | Tributerin                    | 4                        | 1,0     |
| 8                                                     | $\alpha$ -Pinen                     | 2                        | 250     | Phthalsäuredi-<br>methylester | 5                        | 3,5     |
| 9                                                     | $\beta$ -Pinen                      | 2                        | 500     | Phthalsäuredi-<br>decylester  | 4                        | 1000    |
| <u>Terpene mit Sau-<br/>erstoff-Funktion</u>          |                                     |                          |         | <u>Methylester der:</u>       |                          |         |
| 10                                                    | synthet. Juvenil-<br>hormonpräparat | 2                        | 44      | n-Caprinsäure                 | 5                        | 0,5     |
| 11                                                    | DL-Menthol                          | 3                        | 90      | n-Nonancarbon-<br>säure       | 5                        | 50      |
| 12                                                    | Nerol                               | 3                        | 100     | n-Decancarbon-<br>säure       | 5                        | 660     |
| 13                                                    | Phytol                              | 3                        | 300     | n-Undecancar-<br>bonsäure     | 5                        | 1100    |
| 14                                                    | Citral                              | 3                        | 400     | n-Dodecancar-<br>bonsäure     | 5                        | 1700    |
| 15                                                    | $\beta$ -Ionon                      | 3                        | 400     | n-Tridecancar-<br>bonsäure    | 5                        | 550     |
| 16                                                    | $\alpha$ -Terpineol                 | 4                        | 1310    | n-Tetradecan-<br>carbonsäure  | 5                        | 100     |
| 17                                                    | Citronellol                         | 2                        | 2100    |                               |                          |         |
| 18                                                    | Geraniol                            | 3                        | 2500    |                               |                          |         |
| 19                                                    | Farnesol                            | 3                        | 50000   |                               |                          |         |
| <u>Weitere Alkohole,<br/>Aldehyde und<br/>Phenole</u> |                                     |                          |         |                               |                          |         |
| 20                                                    | cis-Hexen-(3)-<br>ol-(1)            | 4                        | 100     |                               |                          |         |
| 21                                                    | p-Hydroxy-<br>benzaldehyd           | 3                        | 14      |                               |                          |         |
| 22                                                    | Carvacrol                           | 4                        | 500     |                               |                          |         |
| 23                                                    | 2.6-Ditertiär-<br>4-methyl-Phenol   | 4                        | 0,5     |                               |                          |         |

\* Die Zahlensymbole 1 - 5 für den Reinheitsgrad bedeuten:

5 = pro analysi, gaschromatographisch einheitlich

4 = purissimum, Gehalt  $\geq 99\%$

3 = purum, Gehalt  $\geq 98\%$

2 = practicum, Gehalt  $\geq 90\%$

1 = technisch, Gehalt  $\geq 90\%$

### 3.8 Vergleichende Untersuchung biologisch aktiver Substanzen

#### 3.8.1 Tabellen

Angeregt durch eine Arbeit von WATANABE et al.<sup>45)</sup> und durch eigene Erfahrungen mit biologisch aktiven Fremdsustanzen wurden vergleichende Versuche mit einer größeren Zahl von Verbindungen mit verschiedenen funktionellen Gruppen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle Nr. 14 (siehe vorangehende Seite), die Formeln der Verbindungen in Tabelle 15 zusammengefaßt.

#### 3.8.2 Diskussion der vergleichenden biologischen Tests

Die Spurwirksamkeit ist stark abhängig von der Kettenlänge des Carbonsäurerestes der Substanzen. Sie hat, wie Abb. 19 zeigt, ein ausgeprägtes Maximum zwischen 10 und 13 C-Einheiten, entsprechend einem Molekulargewichtsbereich von 170 - 220 Masseneinheiten, einem Maximum, das mit maximaler Riechempfindung des menschlichen Geruchsvermögens einherzugehen scheint. Galten die vergleichenden Untersuchungen dieses Kapitels bisher der Frage, welche verschiedenen Stoffe bei Zootermopsis nevadensis Spurfolge auslösen, so lag es nahe zu fragen, wie verschiedene Termitenarten auf dieselbe Substanz reagieren. Der Vergleich wurde mit der aktivsten Fraktion der Aufarbeitung



(Fraktion 6A, s. Kap. 3.1) durchgeführt. Bei der mit *Zootermopsis* nahe verwandten Art *Z. angusticollis* war eine etwa 100-fache Spurstoffkonzentration erforderlich, um eine vergleichbare Reaktion auszulösen.

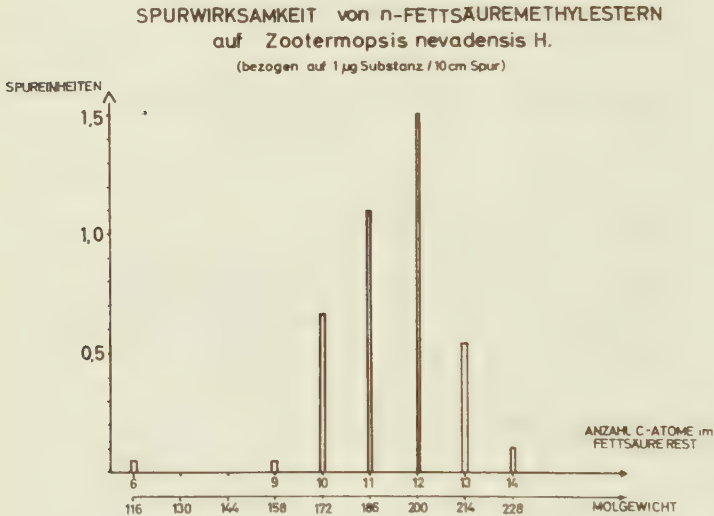


Abb. 19: Spurwirksamkeit von n-Fettsäuremethylestern auf *Zootermopsis nevadensis* H.

Die in Tabelle 14 aufgeführten Substanzen lassen sich einteilen in:

1. Stoffe mit hoher Aktivität ( > 10 000 SE/mg)

Als solche erwiesen sich n-Caprinsäure und Farnesol.

Beim Farnesol fällt auf, daß von den geprüften, chemisch nahe verwandten Terpenen Citronellol und Geraniol keines vergleichbare Wirkung besaß. Dies spricht für eine gewisse Spezifität der Termitenantenne. Farnesol ist im Termitenrohextrakt nicht gefunden worden. Es scheint nicht ausgeschlossen, daß nicht Farnesol, sondern eine verwandte Substanz (oder ein Ester des Farnesols) die 2. wichtige Kompo-

nente des natürlichen Pheromons ist.

2. Stoffe mit mittlerer Aktivität (1 000 - 10 000 SE/mg)

Zu dieser Gruppe gehören einige Verwandte des Farnesols, niedere Prenologe wie Citronellol, Geraniol und  $\alpha$ -Terpineol sowie i-Buttersäure und n-Caprylsäure, eine Homologe der Capronsäure. BOCH und SHEARER<sup>91)</sup> wiesen Geraniol im Sekret der Mandibeldrüsen von Bienen nach. Citronellol ist, wie FESTER und BERTUZZI<sup>92)</sup> fanden, ein Bestandteil des Sekrets der Duftdrüsen von südamerikanischen Alligatoren, in denen die Autoren auch niedrige Carbonsäuren, unter anderem Isovaleriansäure nachweisen konnten.

Ferner zählt zu dieser Gruppe eine Reihe synthetischer Substanzen wie Phthalsäureester, die als Fremdstoffe in den Termitenrohextrakten enthalten waren, sowie einige höhere Fettsäuremethylester. In der Gruppe der Fettsäuremethylester ist eine ausgeprägte Spezifität in Bezug auf die Kettenlänge des Carbonsäureteils auffallend.

3. Stoffe mit schwacher Aktivität (100 - 1 000 SE/mg)

In dieser Gruppe befinden sich verschiedene Derivate, u. a. einige Terpene wie Pinen und Citral. Die physiologischen Bedingungen der hier gefundenen Aktivität sind unklar. Bei anderen Arten sozialer Insekten wurden diese Stoffe als physiologisch wirksam beschrieben. Citral, das in der Mandibeldrüse der Blattschneiderameise *Atta sexdens* vorkommt<sup>34)</sup>, dient als Warn- und Schreckstoff. Citral ist auch ein Nebenbestandteil des Nassanoff-Pheromons von Honigbienen. Es wirkt attraktiv auf Bienenarbeiterinnen.<sup>93)</sup>  $\alpha$ -Pinen,  $\beta$ -Pinen und verwandte monoterpenoide KW fand MOORE<sup>94)</sup> in den Wehrsekreten von 3 Nasutitermes-Arten. Der starke Geruchsreiz kann den Verhaltenskomplex des Spürsuchens künstlich auslösen, ohne daß dem bei Zootermopsis eine biologische Bedeutung zukommen muß. GOETSCH<sup>39)</sup> wies auf die enge Verknüpfung von Alarm- und Spurfolgeverhalten bei

Ameisen und Termiten hin. Bei einigen Ameisenarten können nach WILSON<sup>36)</sup> Alarmsekrete in geringer Konzentration als "attractants" wirken, in hoher Konzentration als Auslöser für Alarm und Angriff.

4. In der Gruppe der sehr schwach aktiven Stoffe (1 - 100 SE/mg) ist eine Mitwirkung von Verunreinigungen der geprüften und als aktiv erkannten Verbindungen nicht auszuschließen. Wäre z. B. Limonen mit nur 1 % Farnesol verunreinigt, so könnte dieses Präparat eine biologische Wirksamkeit vortäuschen, die einem Stoff der nächst aktiveren Substanzgruppe entspricht. Zu den sehr schwach aktiven Substanzen gehören auch die auf Termiten fraßauslösend wirksamen Stoffe wie p-Hydroxy-Benzaldehyd, die, wie BECKER<sup>106)</sup> nachwies, beim Holzabbau durch Basidiomyceten entstehen, sowie ein synthetischer Stoff mit extremer Juvenilhormonaktivität (400 000 Tenebrio-Einheiten/mg).<sup>38</sup>

WATANABE und CASIDA<sup>45)</sup>, die viele, darunter auch einige der in der Tabelle 14 angegebenen Substanzen auf Spurwirksamkeit bei der Termitenart *Reticulitermes flavipes* prüften, erzielten, verglichen mit Zootermopsis, z. T. ähnliche, z. T. abweichende Ergebnisse. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die relative Artspezifität von spurwirksamen Substanzen.

Bei Zootermopsis sind Linalool und  $\alpha$ -Ionon in weiten Konzentrationsbereichen ohne Wirkung; Heliotropin, Zimtaldehyd, Ameisensäure und p-Hydroxy-benzylalkohol wirken auch in hoher Verdünnung noch abschreckend.

<sup>38</sup> Dr. RÖLLER hat uns in dankenswerter Weise eine Probe synthetischen Juvenilhormons überlassen.

#### 4.0 DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Die gestellte Aufgabe erwies sich aus mehreren Gründen als schwierig: Erstens stand wenig Ausgangsmaterial zur Verfügung. Zweitens waren die vorhandenen Mittel und Methoden dem Problem, das mikroanalytisches Arbeiten voraussetzt, nicht angepaßt.

Besonders unangenehm bemerkbar machte sich ein Gehalt an Fremdstoffen im Rohextrakt, hauptsächlich Phthalsäuredecylester und einige seiner Homologen. Sie erwiesen sich als biologisch aktiv und leiteten bei der Zuordnung der gaschromatographischen Gipfel zu biologisch wirksamen Fraktionen in die Irre. Da diese Fremdstoffe in hoher Ausgangskonzentration vorlagen, wurden sie bei der Aufarbeitung zuerst isoliert. Ihre Identifizierung hat zwar die Aufklärung der wirklichen Zusammensetzung des Pheromons verzögert, lieferte aber für die Suche nach weiteren möglichen biologisch aktiven Substanzen einen wertvollen Ansatzpunkt. Entscheidende Fortschritte gelangen mit der Abtrennung der Phthalsäureester durch fraktionierte Hochvakuumdestillation im Kugelorhr und durch weitere Untersuchung der Destillate. Hierbei ließ sich in der leichtflüchtigen Fraktion n-Caprönsäure nachweisen. Sie ist hochaktiv und darf als ein wirksamer Bestandteil des Spurpheromons angesprochen werden.

Die weniger flüchtige Fraktion enthält einen nicht aromatischen Kohlenwasserstoff der Zusammensetzung  $C_{11}H_{20}$ , einen aromatischen Ester mit Molekulargewicht 194 und unter den weiteren aktiven Stoffen eine ungesättigte aliphatische Verbindung mit einer O-Funktion.

Frühere Untersucher von körpereigenen Spurpheromonen bei Termiten fanden jeweils nur eine wirksame Substanz im natürlichen Material. Im Falle der aus Zootermopsis gewonne-

nen Extrakte scheint es jedoch mindestens zwei wirksame Komponenten zu geben. Ob eine synergistische Verstärkung der beiden Stoffe vorliegt, müßten weitere Versuche klären. In Pheromonen von Ameisen der Arten *Lasius* und *Acanthomyops* hatten LAW und Mitarbeiter<sup>95)</sup> allerdings ein Gemisch mehrerer Stoffe gefunden (Terpene und Indolbasen), das wahrscheinlich zur Orientierung beim Hochzeitsflug dient. Bei Sexualduftstoffen<sup>96)</sup> und Aggregationsstoffen<sup>97)</sup> wurde das Zusammenwirken mehrerer Substanzen schon mehrfach beschrieben.

Eine eindeutige Strukturaufklärung der wirksamen Verbindungen wird möglich sein, wenn durch Gaschromatographie mit Kopplung an ein hochauflösendes Massenspektrometer die genauen Elementarformeln bekannt werden. Weitere Versuche mit einem gaschromatographie-gekoppelten IR-Spektrometer, mit einem Mikro-Kernresonanzspektrometer, sowie die genaue Ermittlung von Retentionsinkrementen mit Hilfe von Kapillarsäulen sind notwendig, um die Lage von Doppelbindungen und Verzweigungen in den bisher vorläufig charakterisierten Verbindungen zu bestimmen.

Außer den bereits genannten Verbindungen enthielten die aktivsten Fraktionen hauptsächlich ungeradzahlige KW. Geradzahlige KW mit verzweigtem Gerüst lagen als Nebenbestandteile vor. Das Überwiegen der ungeraden C-Zahlen erklärt sich zwanglos durch den Weg der Biosynthese aus den geradzahligen Fettsäuren, die in der Natur viel häufiger vorkommen als ungeradzahlige. FAST<sup>102)</sup> gibt einen Überblick über die Insektenlipide bis 1964.

Die Frage, ob diese KW auch Bestandteile des Sternaldrüsensekrets sind und daher mit zum Spurpheromon gehören, oder ob sie allein aus der Wachsschicht der Cuticula stammen, läßt sich mit der Methode der Gesamtextraktion nicht klären. Die höheren KW sind zwar biologisch unwirksam. Sie könnten

aber die Rolle natürlicher Fixative spielen und in der Ster-naldrüse selbst vorkommen. Nach PIECK<sup>103)</sup> sollen in Bie-nen freie Säuren und KW vom selben Gewebe gebildet werden können.

Wie zu erwarten war, sind geringe Mengen von Cholesterin und seinem biosynthetischen Vorläufer Squalen in den Gesamt-extrakten enthalten.

Bemerkenswert ist die Beobachtung von BOECKH<sup>104)</sup>, der elektrophysiologisch zeigte, daß Monocarbonsäuren einen Geruchsrezeptor der Heuschreckenantenne erregen. Maximal wirksam ist ebenfalls n-Caprinsäure.  $10^{10}$  Moleküle/cm<sup>3</sup> Luft (= 0,0001 nMol  $\approx$  0,01 ng bei Molgewicht M = 116) lösen die spezifische Reaktion aus. Die kalkulierte Reizschwelle des Spurpheromons von Zootermopsis liegt etwa in derselben Größenordnung.

## TEIL II

### 5.0 Chemische und biologische Untersuchungen an Reviermarkierungsstoffen von Gazellen

Parallel zu den Versuchen, das Spurpheromon der Termiten anzureichern, wurde versucht, einen Reviermarkierungsstoff bei Säugern, der ebenfalls zu den Pheromonen zu zählen ist, zu isolieren. Es ist bekannt, daß bei vielen Säugetierarten die männlichen Tiere nach Eintritt der Geschlechtsreife Duftsekrete absondern und damit ein Revier abgrenzen, das sie für sich als Lebensraum beanspruchen<sup>116-8)</sup> und gegen männliche Artgenossen verteidigen. So scheiden z. B. Hunde mit dem Urin Duftstoffe aus; bei dem einheimischen Rehwild und den überseeischen Antilopen (Gerenuk, Klippspringer und Thomsongazellen) sind es Sekrete aus paarigen Hautdrüsen, den sog. "Antorbital"- oder Voraugendrüsen. Diese sind bei den Männchen besonders stark entwickelt. Das Sekret wird von den Tieren an auffallenden Stellen im Revier, an Zweigen, vorspringenden Steinen und dergleichen abgestreift. Im Falle der Klippspringer, Thomsongazellen und Gerenuks behalten die Männchen dieses Verhalten auch in der Gefangenschaft bei, selbst dort, wo sie die Konkurrenz von Rivalen nicht zu fürchten haben. Eine Beobachtung dieses Verhaltens im Frankfurter Zoo gab die Anregung zu diesen Untersuchungen. Unser Versuchstier war ein Bock des Klippspringers *Oreotragus oreotragus* (Zimm.). Zum Vergleich wurden später auch die Sekrete von Thomson-Gazellen untersucht.

Der Klippspringer-Bock setzt an exponierten Gegenständen in seinem Gehege Duftmarken ab, die er mehrmals in einer Stunde erneuert. Das weiche, zunächst farblose Sekret erhärtet im Laufe weniger Tage unter Schwarzfärbung und ist während Sommermonate in Mengen bis zu 10 g pro Monat zu gewinnen.

In Aussehen und Duft gleicht es dem Sekret der einzigen anderen in Europa gehaltenen Klippspringer, die im Zoologischen Garten Neapel (Dir. Franco Cuneo) leben. Ziel der vorläufigen Untersuchung war es, aus der pechartig erstarrten Masse einen angereicherten Extrakt des Pheromons zu gewinnen und seine biologische Wirkung zu prüfen.

### 5.1 Chemische Versuche

Der Wassergehalt der untersuchten Sekretproben schwankt zwischen 15 und 54 %. Trocknet man das Sekret fünf Tage lang über  $P_2O_5$ , so erhält man glasige, spröde Brocken, die sich zu einem feinen, grauen, fast geruchlosen Mehl verreiben lassen (starke elektrische Aufladung). Dieses Mehl riecht beim Anhauchen, wird aber innerhalb kurzer Zeit wieder geruchlos (Phänomen vielfach wiederholbar). Das Sekretpulver ist in organischen Medien weitgehend unlöslich und gibt auch bei Ultraschallbehandlung keine Duftstoffe an das Lösungsmittel ab. In Wasser quillt es bei  $20^{\circ}C$  langsam, bei  $100^{\circ}C$  sehr rasch auf.

Behandelt man das Sekret mit lipophilen Lösungsmitteln wie Chloroform und Benzol, so erhält man eine Lösung, die beim Verdampfen einen fettartigen Rückstand hinterläßt. Die Menge der in diesen Lösungsmitteln extrahierten Substanzmenge betrug nur wenige % des Trockengewichts. Konzentrierte Laugen und Säuren lösen das Sekret in der Hitze auf. Insbesondere bewirkt reine, konzentrierte Schwefelsäure schon in der Kälte eine langsame Schwarzfärbung ( $SO_2$ -Geruch deutet auf reduzierenden Charakter), völlige Auflösung innerhalb von 1 1/2 Stunden erst in der Hitze ( $300^{\circ}C$ ). Unter den Bedingungen der Kjeldahl-Veraschung beträgt der Stickstoffgehalt 9,6 %, bezogen auf das Trockengewicht (Mittelwert aus fünf Bestimmungen

mit 300 - 500 mg Einwaage). Die Ninhydrin-Probe auf freie Aminosäuren ist im wäßrigen Auszug negativ, die Biuret-Probe stark positiv, der Nachweis von Kohlenhydraten mit der Molisch-Probe im neutralisierten KOH-Auszug positiv. Die durchgeführten Vorproben und das Lösungsverhalten sprechen für eine Grundsubstanz aus Mucoproteinen und/oder Mucopolysacchariden, in der die duftenden Bestandteile in Spuren suspendiert sind. Aus dem wasserklaren Destillat lassen sich die riechenden Bestandteile durch mehrstündige Wasserdampfdestillation teilweise abtrennen und durch mehrfaches Ausschütteln mit gaschromatographisch einheitlichem Pentan oder Diäthyläther anreichern. Beim Abdestillieren des Lösungsmittels unter Normaldruck verflüchtigt sich ein Teil der Riechstoffe in die Vorlage. Fraktioniertes Abdampfen führt zu konzentriertem, scharf riechenden Lösungen. Verlustärmer arbeitet man aber wie beim Einengen des Termiten-Spurpheromons mit der Drehbandkolonne. Der Gehalt an fester Substanz in den gewonnenen konzentrierten Lösungen beträgt etwa 1 %. Bei der nachfolgenden HV-Destillation im Kugelrohr nach WILLSTÄTTER läßt sich das Lösungsmittel restlos entfernen. Die Duftstoffe gehen zwischen 33 und 130°C in die mit flüssigem N<sub>2</sub> gekühlten Vorlagen über. Mit temperaturprogrammierter GLC an einer mit 5 % SE 30 belegten Glassäule von 2 m Länge lassen sich 40 Bestandteile, darunter 15 Hauptkomponenten nachweisen. Zwei davon konnten als unverzweigte, gesättigte Kohlenwasserstoffe mit der Summenformel C<sub>17</sub>H<sub>36</sub> und C<sub>20</sub>H<sub>42</sub> identifiziert werden (Molekülmassen bei 240 und 282 Masseneinheiten). Dies geht aus der Analyse der Bruchstückmuster in den Massenspektren hervor. Außerdem liegen einige bisher nicht näher charakterisierte höhere KW vor.

Versetzt man die konzentrierte Duftstofflösung mit einer kaltesättigten, frisch bereiteten 2.4-Dinitrophenylhydrazin-Lö-

sung in 2N HCl, so fällt eine geringe Menge eines rötlichen Niederschlages aus, der auf vorliegende Aldehyde oder Ketone hinweist. Im Fließmittelsystem Benzol/ Petroläther = 3/1 läßt sich dieser Niederschlag an Kieselgel dünn-schicht-chromatographisch in 5 Flecke mit  $R_f$ -Werten von 0,0; 0,54; 0,65; 0,71 und 0,79 auftrennen, die UV-Licht der Wellenlänge 254 nm absorbieren.

Unterschiede zwischen Oreotragus- und Thomson-Gazellen-Sekret bestehen im Wassergehalt, im Duft und im N-Gehalt:

Tabelle 16

|                                             | Oreotragus                                                                   | Thomson-Gazelle                               |
|---------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Feuchtigkeitsgehalt<br>lufttrockener Proben | 15 - 54 %                                                                    | 10 %                                          |
| Duft                                        | anis- bis kampfer-<br>artig, blumig, in<br>hohen Konzentrationen<br>stechend | modrig, in<br>hohen Konzentrationen<br>tranig |
| N-Gehalt                                    | 9,62 $\pm$ 0,12 %                                                            | 7,26 $\pm$ 0,22 %                             |

## 5.2 Biologische Versuche

Um die Wirksamkeit der chemischen Anreicherungsversuche zu überprüfen, war es notwendig, ebenso wie bei der Isolierung des Termitenpheromons einen biologischen Test heranzuziehen: Das Tier soll mit seinem Verhalten zeigen, ob der das Markierungsverhalten auslösende Duftstoff in dem jeweils gebotenen Extrakt enthalten ist. Das menschliche Geruchsempfinden kann schon deshalb nicht als zuverlässiger Indikator dienen, weil bekanntlich die Riechschwellen für ein und denselben Stoff innerhalb der Klasse der Säuger erheblich schwanken (SCHNEIDER<sup>105</sup>). Daher können Tiere bereits einen in geringer Konzentration vorliegenden Duftstoff bemerken, den der Mensch erst nach vielfacher Anreicherung als Geruchsreiz wahrnehmen kann. Da die chemische Natur der gesuchten Duftstoffe noch weiterer Klärung bedarf, stehen zur Konzentrationsbestimmung auch keine chemischen oder physikalischen Methoden zur Verfügung. Als Test sollte die Markierungstätigkeit des in Frankfurt gehaltenen Klippspringer-Bockes dienen. Das Sekret dieses Tieres wurde als erstes untersucht.

Im Normalverhalten markiert das Tier immer dieselben Stellen seines Geheges, an denen sich nach einiger Zeit Sekretklumpen von einigen Gramm Gewicht anhäufen können.\* Dies gilt auch für das Freilandverhalten, wo das Sekret an bevorzugten Stellen des Reviers abgesetzt wird.\*\*

Zum Versuch wurden an der einen Wand des Innengeheges des Frankfurter Klippspringers jeweils im Abstand von 50 cm

\* Ich danke dem Zoologischen Garten der Stadt Frankfurt (Dir. Prof. Dr. Grzimek) für Sekretproben

\*\* Dr. Frädriich, persönliche Mitteilung

voneinander vier 20 cm lange, geruchlose Nylonstäbe in Augenhöhe des Bockes befestigt. Die Kuppe dieser Stäbe bestand aus porösem Keramikmaterial und konnte nach jedem Versuch gegen eine neue ausgewechselt werden.

Im Blindversuch wurde zuerst die Reaktion des Tieres auf die Stäbe beobachtet. Dieser Versuch wurde mehrmals wiederholt. Dabei zeigte es sich, daß der Bock zunächst die Stäbe beschnuppert und einen oder zwei Stäbe jeweils mit dem Sekret aus den Voraugendrüssen markiert. Im weiteren Verlauf der Beobachtungen, die jeweils 5 Minuten dauerten, kam der Bock immer wieder an den Stäben vorüber, wobei er die zuerst markierten Stäbe bevorzugte und in einem Versuch innerhalb von 5 Minuten 9 mal erneut markierte. Die anderen, nicht markierten Stäbe wurden nicht oder nur gelegentlich markiert. Es zeigte sich, daß die Position der Stäbe keinen Einfluß auf die Häufigkeit hat, mit der sie markiert werden.

Nach diesem Blindversuch wurde etwas von dem früher gewonnenen, nicht fraktionierten Sekret auf einen der Stäbe gebracht und die Markierungshäufigkeit erneut bestimmt. Dabei zeigte es sich, daß der mit dem Sekret behaftete Stab, wiederum unabhängig von seiner Position, im Vergleich zu den anderen Stäben wesentlich häufiger markiert wurde (s. Tab. 17). In der nächsten Versuchsreihe wurde statt des Sekrets je eine der Fraktionen der im Abschnitt 5.1 beschriebenen Aufarbeitung dargeboten. Da diese Extrakte farblos waren, konnte eine optische Orientierung beim Markieren ausgeschlossen werden.

Zu erwarten war nun, daß das Tier denjenigen mit Extrakt befeuchteten Stab besonders bevorzugte, der den gesuchten Duftstoff in maximaler Konzentration enthält.

Wie bereits bei den Vorversuchen wurde dem Bock jeweils für

Tabelle 17: Markierungshäufigkeit des Frankfurter Klippspringerbocks

(Versuchsdauer je 5 min, Ruhepausen 10 min oder länger.  
Eine Versuchsserie dauert maximal 2 Stunden oder umfaßt maximal 8 Versuche.)

Blindversuche

| Häufigkeit des Markierens an         |                                                                 |    |                                                       |
|--------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|----|-------------------------------------------------------|
| älterem, täglich<br>markierten Zweig | während der Vorversuche<br>frisch markierten Stäben<br>Position |    | unmarkier-<br>tem, frisch<br>eingesetztem<br>Teststab |
|                                      | 1                                                               | 2  |                                                       |
| 5                                    | 4                                                               | 9  | 7                                                     |
| 5                                    | 4                                                               | 2  | 0                                                     |
| 3                                    | 3                                                               | 3  | 4                                                     |
| 0                                    | 8                                                               | 1  | 6                                                     |
| Summe                                | 13                                                              | 19 | 15                                                    |
|                                      |                                                                 |    | 17                                                    |

Versuche mit Lösungsmitteln

| Pentan                                                                            |   |   |   |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---|---|---|
| 5                                                                                 | 1 | 4 | 0 |
| 0                                                                                 | 1 | 0 | 7 |
| Summe                                                                             | 5 | 2 | 4 |
|                                                                                   |   |   | 7 |
| Äther                                                                             |   |   |   |
| 7                                                                                 | 4 | 0 | 5 |
| Methanol und n-Butanol                                                            |   |   |   |
| Keine Markierung, sondern Lecken, Beschnupern,<br>Hornangriffe oder rasche Abkehr |   |   |   |

Versuche mit angereicherten Fraktionen und Rückständen

|                                                                              | Wasserdampfdestillation<br>Fraktion Nr.<br>(Angereicherte Fraktionen<br>in Pentanlösung) |             |             | Rückstand der<br>Wasserdampf-<br>destillation |
|------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|-------------|-----------------------------------------------|
|                                                                              | 1                                                                                        | 2           | 3           |                                               |
|                                                                              | 0. -2. Std.                                                                              | 2. -4. Std. | 4. -6. Std. |                                               |
| Gesamtzahl<br>der Markie-<br>rungen wäh-<br>rend einer<br>Versuchs-<br>serie | 47                                                                                       | 17          | 21          | 21                                            |

5 Minuten ein Extrakt an einem der Stäbe angeboten. Gemessen wurde, wie häufig der Bock diesen und die Vergleichsstäbe markierte. Zwischen jedem Versuch lag eine Pause von 10 Minuten. Eine Beobachtungsdauer von 5 Minuten wurde deshalb gewählt, weil nach dieser Zeit die Aufmerksamkeit des Bockes nachließ und oft 10 und mehr Minuten vergingen, ehe er einen weiteren Markierungsgang unternahm. Während dieser Versuche war der Bock entweder allein, oder es waren zwei weibliche Tiere und ein Jungtier anwesend. Diese Tiere nahmen niemals Notiz von den Stäben. Die Versuche ergaben, daß der Bock auf reine Lösungsmittel wie das für die Extrakte verwendete Pentan nicht ansprach, d. h. Stäbe, die mit dem reinen Lösungsmittel getränkt worden waren, wurden nicht signifikant bevorzugt. Auf langsamer verdampfende Stoffe, wie Methanol und n-Butanol, reagierte er mit Zeichen ausgesprochener Mißbilligung, d. h. nach einem kurzen Beriechen des Stabes kehrte sich der Bock schnell ab oder er versuchte, durch Angriffe mit seinem Gehörn die Stäbe zu entfernen. Auf die verschiedenen Extrakte aus seinem eigenen Sekret reagierte der Bock sehr uneinheitlich, vielfach mit heftigen Hornangriffen gegen die betreffenden Stäbe. Beim Wiedervereinen der Pentanphasen mit dem Rückstand der Wasserdampfdestillation war kein synergistischer Effekt zu beobachten. Das spricht gegen die Vermutung, daß während der Aufarbeitung wesentliche Bestandteile des Pheromons im Rückstand verblieben sind.

Parallel zu den Versuchen, in denen dem Bock Extrakte aus seinem eigenen Sekret geboten wurden, haben wir Versuche unternommen, dem Bock Extrakte aus Sekret eines anderen Bockes anzubieten, und zwar eines in Neapel gehaltenen Tieres (s. Tab. 18). Diese Versuche sollten zeigen, ob das Tier in der Lage ist, zwischen seinen eigenen Duftmarken und denen

**Tabelle 18: Markierungshäufigkeit des Frankfurter Klipp-springerbockes bei Reizung mit eigenen und fremden Duftstoffen**

| Agens                                              | Zahl der Versuche | Zahl der Markierungen | Mittelwert |
|----------------------------------------------------|-------------------|-----------------------|------------|
| Stab ohne Extrakt                                  | 2                 | 20 + 10               | 15         |
| Reines Pentan                                      | 1                 | 8                     | 8          |
| Eigenes Sekret,<br>in Wasser gequollen             | 1                 | 12                    | 12         |
| Fremdsekret von Neapel,<br>in Wasser gequollen     | 2                 | 9 + 18                | 14         |
| Angereicherter Pentan-<br>extrakt des Fremdsekrets | 3                 | 10 + 1 + 23           | 11         |

seiner Artgenossen zu unterscheiden, d. h. ob es Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung des Duftstoffes innerhalb einer Art gibt.

Umgekehrt wurden dem in Neapel lebenden Bock Extrakte aus dem Sekret des Frankfurter Klipp-springers vorgeführt. Weder im einen noch im andern Fall kam es zu einer eindeutigen Zunahme der Markierungshäufigkeit, wohl aber zu einer Zunahme der Aufmerksamkeit der Tiere für die fremden Extrakte (verstärktes Schnuppern und Lecken).

Eine Entscheidung in der Frage, ob es individuelle Unterschiede in der qualitativen oder quantitativen chemischen Zusammensetzung des Duftstoffes gibt, steht daher noch aus. Die unklaren Reaktionen der Tiere auf die ihnen gebotenen Extrakte können einmal darauf beruhen, daß die quantitative Zusammensetzung der Duftstoffe durch die chemische Aufarbeitung geringfügig verändert war oder aber daß ein durch die Gefangenschaft bedingtes Fehlverhalten dafür verantwortlich zu machen ist. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurden Freilandbeobachtun-

gen in Afrika durchgeführt, bei denen frei lebende Tiere entsprechende Extrakte angeboten wurden. Experimentelle Gründe verhinderten diese Versuche am Klippspringer, der im felsigen Gelände in Äthiopien lebt. Wir wählten daher als Versuchstier die Thomson-Gazelle, deren Markierungsverhalten dem des Klippspringers ähnlich ist. Das Sekret wurde in einem ähnlichen Aufarbeitungsgang gewonnen. Die Freilandversuche fanden im Steppengelände in ähnlicher Anordnung wie diejenigen im Zoo statt.

Im Abstand von jeweils 3 m wurden zehn bleistiftdünne Stäbchen von 60 - 70 cm Länge im Territorium der Tiere aufgestellt, und zwar in einem Gebiet, in dem sich besonders viele natürliche Duftmarken befanden. Zunächst wurden auch hier zehn völlig unbehandelte Stäbe ausgestellt, ohne daß sie mit der menschlichen Hand in Berührung kamen (Handschuhe). Insgesamt wurden im Laufe eines Tages davon fünf Stäbe markiert. Der Bock verhielt sich dabei genauso wie gegenüber natürlichen Objekten. Diese zehn Stäbe, fünf davon waren markiert, wurden in dem Revier eines Nachbarbockes aufgestellt. In einem Zeitraum von neun Stunden markierte der fremde Bock vier der fünf vom ersten Bock markierten Stäbe, aber nur einen der unmarkierten Stäbe. Daraus geht hervor, daß die Thomson-Gazelle wie der Klippspringer bereits markierte Stäbe bevorzugt erneut markieren.

In einem zweiten Versuch wurden zehn von einem fremden Bock markierte Stäbe und zehn nichtmarkierte Stäbe geboten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 19 zusammengestellt.

Tabelle 19: Freilandversuche mit männlichen Thomson-Gazellen in Tanzania/Ostafrika, durchgeführt von Herrn Prof. Dr. F. Walther im Juli 1966, Markierungshäufigkeit unter verschiedenen Versuchsbedingungen

| Versuch Nr. | VERSUCHSBEDINGUNGEN<br>Art der Stäbe und Duftstoffe                                                                                                                                                 | Beobach-<br>tungszeit-<br>raum(Std. ) | Gesamtzahl der<br>Marken an den<br>aufgestellten<br>Stäben |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| 1           | 10 Stäbe ohne Duftstoffe im eigenen Revier                                                                                                                                                          | 9                                     | 5                                                          |
| 3           | 10 Stäbe ohne Duftstoffe im eigenen Revier                                                                                                                                                          | 12                                    | 5                                                          |
| 2           | simultan 5 nichtmarkierte und 5 von einem fremden Bock markierte Stäbe                                                                                                                              | 9<br>9                                | 1<br>6                                                     |
| 4           | simultan 10 nichtmarkierte und 10 fremdmarkierte Stäbe                                                                                                                                              | 12<br>12                              | 3<br>8                                                     |
| 5           | simultan 40 Stäbe, davon behandelt:<br>10 mit Methanol<br>10 mit Pentan<br>10 mit Fraktion 1 der Aufarbeitung, 1:20 in Pentan verdünnt<br>10 mit Methanol-Rückstand                                 | 9<br>9<br>9<br>9                      | 6<br>2<br>6<br>6                                           |
| 6           | simultan 40 Stäbe, davon behandelt:<br>10 mit Methanol<br>10 mit Pentan<br>10 mit Fraktion 1 der Aufarbeitung, unverdünnt in Pentan<br>10 mit Fraktion 2 der Aufarbeitung, unverdünnt in Pentan     | 9<br>9<br>9<br>9                      | 7<br>3<br>1<br>6                                           |
| 7           | simultan 40 Stäbe, davon behandelt:<br>10 mit Methanol<br>10 mit Pentan<br>10 mit Fraktion 1 der Aufarbeitung, 1:5 verdünnt in Pentan<br>10 mit Fraktion 2 der Aufarbeitung, 1:5 verdünnt in Pentan | 9<br>9<br>9<br>9                      | 5<br>0<br>5<br>7                                           |

Für die Mitteilung der Ergebnisse danke ich Herrn Professor Dr. Walther.

Die Versuche lassen sich folgendermaßen deuten:

1. Die Thomson-Gazelle markiert im Freilandversuch ihre eigenen natürlichen Duftmarken ebenso häufig wie künstlich in ihrem Revier aufgestellte, unbehandelte Stäbe (2 Versuche mit verschiedenen Böcken).
2. Von Rivalen des Nachbarreviers markierte Stäbe werden deutlich häufiger markiert als unmarkierte Kontrollstäbe. Diese Beobachtung ist im Einklang mit der Reviertheorie.
3. Reines Pentan ist in allen Kontrollversuchen unwirksam. Reines Methanol ohne Duftstoffgehalt dagegen ist ebenso wirksam wie 1:5 und 1:20 mit Pentan verdünnte Extrakte aus dem natürlichen Duftsekretkonzentrat.
4. Stäbe, die mit konzentrierter Lösung des Duftstoffs bestrichen sind, scheinen die Thomson-Gazellen zu meiden. Ob es sich dabei um eine abschreckende Wirkung handelt, müssen weitere Versuche zeigen.
5. Fraktion 1 und Fraktion 2 entstammen derselben Sekretprobe. Sie wurden innerhalb der 1. - 45. und der 46. - 80. Minute durch Wasserdampfdestillation gewonnen und dann auf gleiche Weise weiterverarbeitet. Sie unterscheiden sich in ihrer Wirkung auf die Thomson-Gazellenböcke nicht signifikant.

## 6.0 DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die bisherigen Versuche für eine Pheromonwirksamkeit des Voraugendrüsenssekrets sprechen. Da allerdings das Verhalten der Gazellen gegen unmarkierte Teststäbe schon deutlich positiv ist, sind die Voraussetzungen für einen quantitativen Verhaltenstest ungünstig. Es bedarf sehr umfangreicher Versuchsserien, um gesicherte Unterschiede gegenüber künstlich markierten Stäben zu erfassen.

Positive Verhaltensreaktionen wurden sowohl mit dem Wasserdampfdestillat wie mit dem Rückstand der Wasserdampfdestillation beobachtet. Ob hier auch wie beim Termitenspurpheromon mehrere Stoffe für die Verhaltensreaktion verantwortlich sind, die sich in verschiedenen Fraktionen finden, oder ob das Fraktionierungsverfahren nicht scharf genug ist, läßt sich noch nicht klar entscheiden. Andererseits lassen die oben skizzierten Schwierigkeiten des Tests die chemische Bearbeitung des Problems vor der endgültigen Klärung der biologischen Grundlagen wenig aussichtsreich erscheinen. Die Möglichkeit, mit Hilfe künstlicher Duftmarken Wildwechsel und Reviere von Gazellen zu verändern, die im Bereich von Plantagen mit wertvollen Nutzpflanzen liegen, wird daher eine Aufgabe der Zukunft bleiben.

Bemerkenswert ist schließlich das Vorkommen von höheren Kohlenwasserstoffen im Voraugendrüsensekret. Es ist denkbar, daß diese Stoffe wie im Falle des Termitenspurpheromons Fixative für das natürliche Duftsekret darstellen.

### TEIL III

## 7.0 BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

### 7.1 Biologische Versuche

#### 7.1.1 Ausgangsmaterial

Als Ausgangsmaterial dienten Termiten der Art *Zootermopsis nevadensis* H., die in den Wäldern der nordamerikanischen Westküste vorkommen. Die Tiere wurden im Herbst 1963 in Naturparks in der Nähe von Monterey/Kalifornien von Herrn Professor Lüscher, Bern, gesammelt. Das im Laufe von 2 Arbeitswochen gesammelte Rohmaterial (insgesamt 1.6 kg Termiten) wurde jeweils am Abend - ohne die Termiten vorher nach Kastenzugehörigkeit in Arbeiter und Arbeiterinnen, Soldaten, Nymphen und Geschlechtstiere gesondert zu haben - eine und anschließend noch 2 Stunden mit Äther, dann mit Methanol und endlich unter Zermörsern mit Äthanol (30 % Wassergehalt) extrahiert. Alle Extrakte wurden durch Papierfilter filtriert; die ätherischen Lösungen wurden am Rotationsverdampfer bei Normaltemperatur, die Methanolphase bei 70 - 80°C eingedampft. Als Rückstände blieben gelbliche Öle, die in Plastikflaschen gesammelt, aufbewahrt und bis zur Aufarbeitung in Marburg mit kurzen Unterbrechungen durch den Transport bei Temperaturen von - 10 bis 0°C gehalten wurden.

#### 7.1.2 Tierhaltung

Lebendige Termiten der Art *Zootermopsis* für die biologischen Tests wurden in 9 Kolonien zu je etwa 50 Termiten gehalten. 2 dieser Kolonien entstammten Beständen des Physiologisch-Chem. Instituts der Universität München aus der Zeit 1961 - 1963, 7 weitere Kolonien vom September 1963 stellte Professor Lüscher, Bern, zur Verfügung. Unter "Kolonie" sei ein Einweckglas verstanden, in dem auf einer 2 cm dicken, feuchten Gips- oder Erdeschicht pilzbefallene Kiefernholzstücke aufgeschichtet sind. Diese dienen den Termiten als Nest- und Futtermaterial. Die Kolonien sind mit Glasdeckeln lose abgedeckt, um Luftzutritt zu ermöglichen.

### 7. 1. 3 Das Futter

Die Brauchbarkeit des Holzes war an bestimmte Bedingungen geknüpft : Während Termiten frisches, harzreiches Kiefernholz aus rindennahen Stammteilen nur langsam anfressen, ist der Befall des Holzes deutlich beschleunigt, wenn man Kernholz anbietet, das einen Jahresringabstand von mehr als 2 mm aufweist und 1 - 2 Jahre abgelagert ist. Nach Beobachtungen von BECKER<sup>106)</sup> erleichtert den Termiten eine Vorbehandlung des Kiefernholzes mit Basidiomyceten der Art *Coniophora cerebella*\* das mechanische Eindringen und die chemische Verwertung als Futter ganz erheblich. In Vorversuchen wurde festgestellt, daß Zootermopsis Kiefern- und Tannenholz vor Laubholz wie Eiche, Buche, Pappel, Esche und Linde\*\* sowie vor tropischen Hölzern bevorzugt. Bei Bedarf werden basidiomycetenbefallene Holzstücke einige Stunden bei 130°C sterilisiert, mit abgekochtem Leitungswasser befeuchtet und in die Kolonie so eingelegt, daß jeweils zwei Holzstücke mit der Stirnseite aufeinanderliegen. Die Termiten halten sich normalerweise über die gesamte Kolonie verteilt, versammeln sich aber beim Zulegen so präparierten Holzes in der obersten Schicht zwischen den beiden Hölzern. Das erleichtert die Entnahme einer genügenden Zahl von Tieren für die biologischen Tests, ohne daß man jedes Mal die ganze Kolonie ausräumen muß. Um hohe Feuchtigkeit der Kolonien zu gewährleisten, füllt man 2 mal pro Woche einige ml abgekochtes Leitungswasser in jede Kolonie. Als zusätzlicher Wasservorrat dient eine Masse aus 3 % Agar und 10 % Kiefernholzmehl. Sie wird alle 2 - 3 Monate erneuert.

---

\* Eine Probe von *Coniophora* verdanke ich Professor Becker, Bundesanstalt für Materialprüfung, Berlin-Dahlem.

\*\* Für Holzproben danke ich der Dreherei O. Happel, Marburg

#### 7.1.4 Der Arbeitsplatz

Der Raum zur Aufbewahrung der Kolonien, zur Ausführung des biologischen Tests und zur Nachzucht neuer Kolonien muß bestimmten Anforderungen genügen. Zootermopsis ist nach Beobachtungen von LÜSCHER<sup>50)</sup> gegen Luftzug, zu geringe Luftfeuchte, gegen Sonnen- und Neonlicht, sowie gegen Hitze und Kälte empfindlich. Als Labor wurde daher ein fensterloser Raum gewählt, der durch einen Umluftthermostaten auf  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$  Temperatur gehalten wurde. Zur Stabilisierung der Luftfeuchte (Mittel 60 % rel. Feuchte) wurden Schalen mit feuchten Filterpapierbogen aufgestellt. Das Licht einer 15-Watt-Glühlampe mit vorge-schaltetem Rotfilter reichte aus, um den Arbeitsplatz nach Adaptation des Auges genügend zu erhellen, ließ aber die Termiten, die für rotes Licht unempfindlich sind, ungestört.

#### 7.1.5 Nachzucht von Kolonien

Die Individuenzahl von Termitenkolonien unterliegt natürlichen Schwankungen. Trotz sorgfältiger Pflege kann es aber vorkommen, daß Kolonien aussterben, wenn schädliche Schimmelpilze gelegentlich überhandnehmen. Von außen sichtbare, mit weißgrauen Schimmelbelägen behaftete Holzteile der Kolonien wurden daher nach Möglichkeit sofort entfernt. Um den Fortgang der Arbeit von unkontrollierbaren Einflüssen dieser Art unabhängiger zu machen, und um zur Auswertung von Reihenversuchen eine möglichst große Auswahl frischer Kolonien bereit zu haben, schien es sinnvoll, neue Kolonien nachzuzüchten. Von April bis Juli 1965 traten in einigen Kolonien erstmals geflügelte Tiere auf. Sie stimmten in ihren äußeren Merkmalen mit der Beschreibung überein, die HERFS<sup>107-8)</sup>, GÖSSWALD<sup>109)</sup> BECKER<sup>115)</sup> und LÜSCHER<sup>50)</sup> für schwarmbereite Geschlechtstiere geben. Unter günstigen äußeren Bedingungen kommt es zum Schwarm-

flug, der Voraussetzung für den Abwurf der Flügel, für das Einnisten in Holz und für die Entwicklung der Ovarien und Spermiengane ist. Zum Nachahmen der natürlichen Bedingungen des Schwarmfluges im Labor diente ein "Flugkäfig" mit engmaschigem Nylonnetz von würfelförmiger Gestalt. In diesen Käfig wurden diagonallaufende, feuchte Filterpapierstreifen eingespannt. Angelockt vom Schein einer Glühlampe verließen die schwärmenden Geschlechtstiere die im Flugkasten offen aufgestellten Kolonien und flatterten, nunmehr positiv phototaktisch geworden, im Käfig auf und ab, bis einige von ihnen nach einem Tag die Flügel abwarfen und vor dem Licht in feuchtes Holzmehl flüchteten, das am Boden des Kastens aufgestellt war. Diese Tiere, etwa 10 % der Anzahl ausgeschwärmter Tiere, wurden gesammelt und paarweise in Glasröhren von 2 cm Durchmesser und 4 cm Höhe gesetzt, die im verkleinerten Maßstab den schon beschriebenen Kolonien entsprachen. In 3 von 6 neuangelegten Kolonien erschienen nach 5 Monaten (im November 1965) die ersten Jungtiere. Leider ist die Vermehrungsrate bei Zootermopsis selbst unter günstigen Bedingungen gering, so daß eine Nachzüchtung vieler Kolonien oder gar eine Entnahme aus Großzuchten für Extraktionen des Spurpheromons die Möglichkeiten eines Universitäts-Labors übersteigt.

#### 7.1.6 Ausführung des biologischen Tests

Ein 130 x 85 mm großer, rechteckiger Kasten aus Plexiglas mit 4 mm hohen Seitenwänden ist durch einen Schieber in zwei Kammern zu trennen; In der kleineren der Länge 28 mm sitzen 10 frisch aus der Kolonie entnommene, mehrere Minuten ausgeruhte Termiten, ehe sie durch das vom Schieber freigegebene Loch in die Laufkammer schlüpfen, in der der Verhaltenstest stattfindet. In diese Laufkammer ist ein 96 mm langes Schreibmaschinenpapier ( $80 \text{ g/m}^2$ ) mit glatter Oberfläche eingelegt, auf dem mit Hilfe einer feinen 10  $\mu\text{l}$ -Pipette eine 5-fach abgewinkelte 100 mm lange und 2 mm breite Spur der zu testenden Spur-

stofflösung aufgetragen ist (Abb. 1 b). Um störenden Luftzug<sup>51)</sup> abzuhalten, ist das Gehäuse mit einer Plexiglasplatte überdeckt. Es steht während des Tests bei 23°C und 60 % Luftfeuchte auf einem erschütterungsarmen Schaumstoffpolster und ist zur Orientierung des Beobachters mit Dunkelkammerrotlicht beleuchtet, das Termiten nicht wahrnehmen. Die Termiten treten nacheinander einzeln in den Laufkasten ein, und orientieren sich dort mit den Antennen, die sie nach links und rechts schwenken. Enthält die zu prüfende Lösung genügend aktive Substanz, so bewegen sich die Termiten auf der für sie unsichtbaren, aber geruchlich markierten Spur vorwärts, bis sie an die Stelle gelangen, an der sich der Weg sternförmig im Winkel von 120° gabelt. Nach kurzem Verharren wählen die Termiten stets die mit Spurstoff markierte Richtung ( die mit reinem Lösungsmittel gezogene Spur dient der Kontrolle), gelangen, falls der Reiz weiterhin konstant ist, zur nächsten Ecke, verharren kurz, lassen sich in die neue Richtung leiten usw. und gelangen schließlich nach der 5. Ecke ans Ende der Spur; Dort finden sie unter den künstlichen Bedingungen des Tests kein Futter, kehren nach einigem Zögern um und legen meist denselben Weg zum Eingangsloch zurück. In diesem Augenblick entfernt man die Termite mit einer weichen Stahlfederpinzette aus der Kammer, um Informationsaustausch durch Berührung mit dem nachfolgenden Tier zu vermeiden. Die Zahl der richtig durchlaufenen Ecken wird in einem Testprotokoll notiert und nach der in Tabelle 1 angegebenen Skala ausgewertet. Die Termite wartet in einer bedeckten Petrischale auf den nächsten Test. Der Zeitbedarf für 10 Termiten beträgt im Mittel 30 Min., kann aber bei Testen niedriger Konzentration weitgehend lipoidfreier Fraktionen sehr viel länger dauern, da die Spurwirkung dann rasch nachläßt (Zootermopsis sondert unter den Testbedingungen kein eigenes Sternaldrüsensekret ab). Um Verfälschungen des Ergebnisses zu vermeiden, werden solche Tests nach 1 Std. abgebrochen und mit einer höheren Konzentration (50 µl statt 10 µl Lösung) wiederholt.

Unterschreitet die Konzentration des spurauslösenden Prinzips einen Schwellenwert, so verlieren die Termiten die Spur, meist an einer

Ecke, die als Testbedingung besonders kritisch ist, und laufen dann ohne Orientierung regellos suchend weiter. Um bei mehreren Tests mit denselben Tieren eine allmähliche Konditionierung in einer bestimmten Richtung zu vermeiden, vertauscht man auf der mit einer Schablone gezogenen gleichmäßigen dünnen Bleistift - nicht Kugelschreiberspur in zufälliger Folge Testlösung und reines Lösungsmittel.

Gleichmäßiges Auftragen ist vor allem im Bereiche geringer Konzentration sehr kritisch. Sie läßt sich dadurch erreichen, daß die rundgeschliffene Pipettenspitze mit gleichmäßiger Geschwindigkeit über das Papier bewegt wird (etwa 20 mm/sec.). Dabei wird der Pipetteninhalt durch Kapillarwirkung des Papiers gleichmäßig entleert.

Da eine häufige Störung der Tiere in Kolonien die Zuverlässigkeit der Verhaltensreaktion ungünstig beeinflusste, wurden mit 1 Kolonieninhalt (ca. 50 Tiere) mehrere Versuchsserien nacheinander ausgeführt, wobei wegen der Gefahr der Adaptation der Geruchsrezeptoren zuerst die niedrigen, dann die höheren Konzentrationen getestet wurden. Zwischen diesen Serien lagen mindestens 1-stündige Ruhepausen.

#### 7.1.7 Präparation von Termitensternaldrüsen

Erwachsene Larven von *Zootermopsis* werden der Kolonie entnommen und mit Präpariernadeln auf einer 4 mm dicken Unterlage von Bienenwachs /Paraffin/Kohlepulver = 1/4/2 fixiert und durch Dazulegen von kleinen Stücken festen  $\text{CO}_2$  betäubt. Äther eignete sich als Narkotikum wegen seiner krampfauslösenden Wirkung auf die Abdominalregion der Termiten nicht. Unter stereomikroskopischer Kontrolle (Vergrößerung 2.5-fach) wurde mit Hilfe einer feinen Pinzettenschere ein 1 x 1 mm großes Stück der Ventralcuticula mit der Sternaldrüse

ausgeschnitten und zusammen mit 2 weiteren Präparaten dieser Art in eine einseitig abgeschmolzene, dünnwandige Glaskapillare von 10 µl Rauminhalt gesteckt. Beim Eintauchen des offenen Kapillarenendes in reines Pentan wurde etwas Lösungsmittel aufgesaugt und durch Eintauchen des verschlossenen Endes der Kapillare in fl. N<sub>2</sub> in den unteren Teil der Kapillare gezogen. Dort fror das Pentan zusammen mit den Präparaten fest. In diesem Augenblick wurde das offene Ende der Kapillare mit einer spitzen Gebläseflamme verschmolzen.

Zur Kontrolle wurden denselben Termiten gleichgroße Stücke aus der Dorsalcuticula entnommen und ebenso verarbeitet.

Reproduzierbare Gipfelmuster im GLC, die sich signifikant von den Kontrollen unterschieden, waren bislang nicht zu erhalten.

## 7.2 Chromatographische und spektrometrische Versuche

### 7.2.1 Dünnschichtchromatographie

Die DC-Platten hatten das Format 10 x 20 und 20 x 20 cm und wurden mit einem Desaga-Streichgerät beschichtet. Das hierzu verwendete Kieselgel nach STAHL enthielt den Fluoreszenzindikator HF 254 + 350. Nach 12-stündigem Trocknen an Luft wurden die Platten in einem Holzkasten aufbewahrt, durch einmaliges Vorentwickeln mit dem später verwendeten Fließmittelgemisch von Verunreinigungen befreit und ohne weitere Aktivierung verwendet. Fließmittelgemische, deren Zusammensetzung in Volumenteilen angegeben ist, wurden jeweils frisch zubereitet. Eingelegtes Filterpapier sorgte für Kammersättigung. Die Proben wurden manuell mit einem Fp.-Röhrchen aufgetragen und, wenn nicht anders angegeben, auf angewärmter Platte durch Besprühen mit halbkonz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 10-minütiges Backen bei 110°C nachgewiesen.

## 7.2.2 Gaschromatographie

Die Versuchsergebnisse wurden mit dem Doppelsäulengerät "Aerograph, Typ 1520" der Firma Varian-Aerograph gewonnen, das mit einem Honeywell-Schreiber von 1 mV Eingangsempfindlichkeit gekoppelt und mit einem "Matrix Temperature Programmer" ausgerüstet war. Die Trägergase  $N_2$  und He und die zum Betrieb des FID nötigen Gase  $H_2$  und synthetisches Luftgemisch  $O_2/N_2 = 20/80$  hatten die Qualität "nachgereinigt". Sie wurden Stahlzylindern entnommen, die über doppelstufige, regelbare "Saturn"-Druckminderer der Firma Dräger, Lübeck, mit dem GLC-System verbunden waren. Zur Einstellung konstanter Gerätebedingungen wurden Elektronik und Detektor 1 Std., bei der Bestimmung der Retentionsindices nach KOVÁTS<sup>69)</sup> 8 Std. vor Beginn der Messungen eingeschaltet. Der Trägergasstrom wurde am Säulenende mit einem Seifenfilmströmungsmesser bestimmt. Das Verhältnis der Brenngase für den FID wurde auf maximale Nachweisempfindlichkeit für KW eingestellt. Die zu prüfenden Substanzgemische wurden in leichtverdampfbaren Lösungsmitteln gelöst und mit Hilfe von "Hamilton"-Spritzen in den mit einem Glasinlet ausgekleideten Verdampferblock injiziert, dessen Temperatur mindestens  $20^\circ C$  über der Säulentemperatur lag. Die Silikongummidichtungen des Verdampferblocks waren bei 0.1 Torr mehrere Std. auf  $200^\circ C$  erhitzt worden, um leichter flüchtige Inhaltsstoffe auszuheizen. "Ghost"-Gipfel beim Temperaturprogrammieren ließen sich dadurch weitgehend vermeiden.

Gaschromatographisch getrennte Fraktionen für den biologischen Test wurden in Glasfläschchen (s. Abb. 10) aufgefangen und zur Vermeidung von Verdunstungsverlusten in spitz zulaufende Schliffröhrchen (NS 14.5) mit je 1.5 ml Inhalt umgefüllt. Diese wurden bis zum Beginn des biologischen Tests in entsprechend konischen Bohrungen eines eisgekühlten Al-Blocks einheitlich aufbewahrt.

Die GLC -Auftrennversuche des Pheromonkonzentrats (s. Abb. 11) wurden an einer SE 30 Säule unter folgenden Bedingungen vorgenommen: Durchmesser der Glassäule: 1/4 Zoll, Länge 1.5 m, Trägergasstrom 30 ml  $N_2$ /min., FID-Temperatur 202°C, Einspritzblock 225°C, Stufentemperaturprogramm 80-262°C mit Anstiegsraten von 6, 4 und 2°C/min.

Die Bedingungen, unter denen die Carbonsäure-Bestandteile der leichtflüchtigen Fraktion 5 A nachgewiesen wurden, sind in Tabelle 11 bereits angegeben. Für die in Abschnitt 3.5.4 zusammengefaßten Versuche wurden 1.5 m lange Säulen mit SE 30 und Carbowax 20 M mit je 1/8 Zoll Durchmesser verwendet.

Der im Abschnitt 3.5.7 beschriebene Auffangversuch von Bestandteilen der Fraktion 6 A fand an einer 1.5 m langen, mit 5% SE 30 belegten Säule statt. Die Säulentemperatur stieg zwischen 100 und 260°C gleichmäßig mit 4°C/min. an. Die in Abb. 16 unmittelbar unter der Registrierkurve angegebenen Zahlen sind mit dem Disc-Integrator ermittelte relative Flächeneinheiten der einzelnen Gipfel, bezogen auf die (=100 % gesetzte) Gesamtfläche unter der Kurve. Diese Flächeneinheiten entsprechen in 1. Näherung den Anteilen der Einzelgipfel am Gesamtgemisch in Gewichtsprozent.

### 7.2.3 Herstellung von GLC-Trennsäulen aus Metall und Glas für die Gaschromatographie

Käufliches "Chromosorb W" der Korngröße 60 - 100 mesh, mit Trimethylchlorsilan silanisiert und durch Benetzungsversuche auf hydrophobe Oberfläche geprüft (Teilchen müssen auf der Wasseroberfläche schwimmen), wurde mit  $CH_2Cl_2$  p. a. suspendiert und mit einer 5-10 gewichtsprozentigen, erwärmten Lösung der jeweiligen Flüssigphase vereinigt. Nach etwa einer Stunde wurde unter schwachem Vakuum (100-200 mm Hg) das Lösungsmittel in der Wärme (40°C) abgesaugt. Gegen Ende des Eindampfvorgangs wurden an der Kolbenwand

sich bildende Krusten durch Vibration zum Abfallen gebracht, um das bevorzugte Niederschlagen der konzentrierten Lösung der Flüssigphase zu vermeiden. Beim Anlegen eines kräftigen Vakuums, Erwärmen des Wasserbades bis zum Sieden und unter langsamem Drehen des Kolbens entstand ein lockeres, trockenes, leicht in Rohre einfüllbares Pulver. Veränderungen durch Abrieb ließen sich mit dieser Methode geringhalten.

Cu-, Al- oder Chromnickelstahlrohr verschiedener Durchmesser und Längen wurden nach Auswaschen mit dest.  $\text{CH}_3\text{OH}$  im Trockenschrank getrocknet und gerade ausgerichtet. In senkrechter Stellung wurde am unteren, durch Glaswatte verstopften Ende Ölpumpenvakuum angelegt.

Mit Hilfe eines Trichters wurden unter stoßweisem Aufklopfen des Rohrendes auf einem rotierenden Nocken Trägerphase eingefüllt, bis sich keine weitere Substanz mehr unterbringen ließ.

Unter häufigem Klopfen mit einem Holzstab wurde das Stoßen eine Stunde fortgesetzt. Nach Verschließen des freien Endes mit einem Glaswollestopfen war das Trennsäulenrohr zum Wendeln um einen Stahlzylinder des Durchmessers 100 mm bereit. Glassäulen wurden in gewendelm Zustand gefüllt und solange geklopft, bis keine weitere Trägerphase mehr unterzubringen war. Die erhaltenen schraubenförmigen Trennsäulen wurden mit "Swagelok"-Anschlüssen versehen und im Ofen des Gaschromatographen bei der für die jeweilige Flüssigphase zulässigen Grenztemperatur unter  $\text{N}_2$ -Durchfluß von 10 - 20 ml/min. ausgeheizt. Das dem Detektor zugekehrte Ende der Trennsäule blieb während der ersten 12 Stunden vom Detektor abgetrennt, um eine Verunreinigung der Zuleitungen zum FID zu vermeiden. Das ist besonders für Arbeiten unter hoher Verstärkung wichtig. So hergestellte Trennsäulen zeigten nach etwa 2 Std. selbst bei hoher Verstärkung eine Nulllinie ohne nennenswerte Drift.

Zur genaueren Prüfung wurde das Trennvermögen mit Hilfe

homologer n-Paraffine nach KAISER<sup>110)</sup> bestimmt. Die Werte für die Trennleistung lagen im Durchschnitt bei 1000 - 2000 theoretischen Böden. Auf der Säule während des Betriebs zurückgebliebene Verunreinigungen waren durch mehrfaches T-programmiertes Ausheizen bis zur Grenztemperatur entfernbar. Dies wurde durch Aufnahme eines Blind-Chromatogramms vor der eigentlichen Probenaufgabe geprüft.

#### 7.2.4 Kontinuierliche Kopplung GLC-MS :

Als Meßgerät diente ein von RYHAGE<sup>81)</sup> beschriebenes GLC-gekoppeltes Massenspektrometer LKB 9000 der Firma LKB Produkter, Stockholm. Das in Abb. 17 dargestellte GLC und die zugehörigen MS in Abb. 18.1 bis 18.8 wurden unter folgenden Bedingungen gemessen:

GLC-System : Probemenge : 5  $\mu$ l, Fraktion 6 A, ohne Lösungsmittel, Einspritzblock 240°C, Säulentemperatur : 110 - 250 °C, Temperaturprogramm mit Anstiegsrate 3°C/min. , Trägergasstrom : 30 ml He/min. , Trennsäule: 5 % SE 30, Glasrohr mit 2 mm Innendurchmesser, Länge 2.7 m. , GLC-Schreiberempfindlichkeit : 10 mV.

Separator: 2-stufig nach BECKER - RYHAGE, Temperatur = 260°C.

MS-System : Ionenquellentemperatur : 290°C, Ionisationsenergie für GLC-Kanal : 20 eV, für MS-Kanal : 70 eV, Ionisationsstrom : 60  $\mu$ A, Spannung des Elektronenvervielfachers : 1.9 - 2.1 kV.

Der Massenbereich von m/e = 20 bis 400 wurde jeweils in 4.2 sec. durchfahren, sobald der GLC-Gipfel maximale Höhe erreicht hatte.

Das Gipfelmuster war im besonders interessierenden Bereich zwischen 0 und 15 min. nach Injektion der Probe besser aufgelöst, wenn die Probe unter sonst gleichen Bedingungen an einer offenen, 150 m langen Stahlsäule (Flüssigphase SF 96) mit 0.8 mm lichter Weite und einem He-Strom von 50 ml/min. aufgetrennt wurde.

Zur Auswertung der gewonnenen Massenspektren wurden die Linien des Untergrundes abgezogen. Dabei blieben Differenzspektren übrig, deren höchste Linien = 100 % gesetzt wurden. Auf diese wurden alle anderen Linien bezogen.

### 7.2.5 IR-Spektroskopie

IR-Spektren wurden mit dem Zweistrahlgerät IR 125 der Firma Bodenseewerk Perkin-Elmer aufgenommen. Für die Versuche in Tab. 4 a und in den Abb. 13 a, 13 b und 15 wurden 2 NaCl-Scheiben verwendet, zwischen denen die flüssige Probe ohne Lösungsmittel als dünner Film eingeschlossen war.

### 7.2.6 UV-Spektroskopie

Die in Tabb. 4 b angegebenen Werte wurden mit dem registrierenden Beckman-UV-Spektrometer DK-2, die in Tabb. 6 aufgeführten Werte mit dem Beckman-Gerät DB-G gewonnen. Die Meßküvetten mit Schichtdicke 1 cm bestanden aus Quarz. Im Vergleichsstrahl befand sich eine Küvette mit dem reinen Lösungsmittel Pentan.

## 7.3 Chemische Versuche

### 7.3.1 Wasserdampfdestillation

Die in Abb. 6 dargestellte Apparatur wurde aus handelsüblichen Laborgeräten zusammengebaut. Der elektrisch beheizbare Dampf-

überhitzer bestand aus Pyrex-Glas. Er wurde in der Glasbläserwerkstätte des Instituts angefertigt. Dampfentwickler und Überhitzer wurden so beheizt, daß das Thermometer  $130^{\circ}\text{C}$  Dampftemperatur anzeigte. Der Wasservorrat war vorgesehen, um die heiße Apparatur kontinuierlich betreiben zu können. Die volle Vorlage 1 wurde, ohne den Dampfstrom zu unterbrechen, jeweils rasch durch eine neue ersetzt. Der Blasenabscheider, der die Blasen des anfangs heftig schäumenden Rohextrakts niederschlug, war mit einem elektrisch heizbaren Band umwickelt.

Eingesetzte Menge (aus je 1/10 der Menge des Rohextrakts):

$10.58 \cdot 10^6$  SE, wiedergewonnenen Menge:  $10.0 \cdot 10^6$  SE  $\hat{=}$  94,5 % Ausbeute.

### 7.3.2 Pentanextraktion

Obwohl es gelang, die bei der Wasserdampfdestillation sich bildenden Schaumblasen vollständig zurückzuhalten, bildeten sich beim Ausschütteln der Wasserdampfdestillate im Scheidetrichter Emulsionen, die sich außerordentlich langsam auflösten. Die wässrige Phase wurde daher mit dem organischen Lösungsmittel überschichtet, der Schütteltrichter wurde unter häufigem Belüften vorsichtig hin und her geneigt. Beim häufigen Wiederholen konnten sich die nicht mischbaren Phasen auf der Glasoberfläche ins Gleichgewicht setzen, ohne daß Emulsionen auftraten.

Eingesetzte Menge:  $25 \cdot 10^6$  SE (1/4 der Gesamtmenge), nach 5 Verteilungsschritten mit je 1/10 Volumen Pentan wiedergewonnene Menge  $124 \cdot 10^6$  SE  $\approx$  500 % (Erklärung siehe Abschnitt 3.2.3).

### 7.3.3 Herstellung gaschromatographisch reinen n-Pentans

"n-Pentan, etwa 99 %" der Firma Merck, Qualität p. a., enthielt bei der GLC-Prüfung merkliche Mengen Begleitstoffe, die sich durch hohe Retentionszeiten im Vergleich zum Hauptbestandteil auszeichneten. Je 2 Liter dieses n-Pentans wurden durch Erwärmen

im Wasserbad (50°C) über eine, versilberte Vakuummantelkolonne (40 cm lang, 2.5 cm  $\phi$ , Glasfüllkörper) mit Rücklaufverhältnis 1 : 5 abdestilliert, bis  $\frac{3}{4}$  der Menge übergegangen waren. Im Rückstand waren die Komponenten mit hoher Retentionszeit angereichert. Sie wurden verworfen. Das Destillat wurde unter denselben Bedingungen redestilliert. In 5  $\mu$ l-Proben waren höhersiedende Anteile gaschromatographisch bei höchster Verstärkung des FID nicht mehr nachweisbar.

Auf die Notwendigkeit, für die Anreicherung von Naturstoffen Lösungsmittel größt möglicher Reinheit zu verwenden, weist unabhängig SCHÜBEL<sup>113)</sup> hin.

#### 7.3.4 Eindampfen der Pentanlösung über eine Drehbandkolonne <sup>114)</sup>

Das Abdampfen des hohen Pentanüberschusses wurde an einer Drehbandkolonne der Firma Ernst Haage, Apparatebau, Mühlheim/Ruhr, durchgeführt. Die abzdampfende Lösung wurde in dem Maß in einen 2-Hals-Kolben nachgetropft, in dem das reine Lösungsmittel unter Normaldruck in die Vorlage überdestillierte. Die Temperatur des Kolonnenheizmantels lag 2° unter der Siedetemperatur des Pentans. Die Geschwindigkeit des Drehbands betrug 1000 - 2000 Umdrehungen/min. Die Pheromonausbeute war größer als 99 %.

#### 7.3.5 HV-Destillation im Kugelrohr

Kugelrohre aus Pyrex-Glas mit 6 mm  $\phi$  wurden in der in Abb. 14 dargestellten Form geblasen und mit einer abgewogenen Menge Pheromonkonzentrat gefüllt, indem die flüssige Substanz mit wenig Lösungsmittel in die abgetrennte Kugel gespült und unter Kühlung mit fl. N<sub>2</sub> festgefroren wurde. Nach dem Wiederanschmelzen der Kugel wurde das Rohr an einer Ölpumpe auf 0,1 Torr evakuiert und unter Eintauchen des U-Rohrs 1 in fl. N<sub>2</sub> mit einer Hg-Pumpe verbunden. Nach 5 min. war das Endvakuum (besser als 10<sup>-3</sup> Torr) erreicht; das Lösungsmittel war in das U-Rohr 1 überkondensiert. Unter Eintauchen des U-Rohres 2 begann die HV-Destillation, während die Kugel in einem Heißluftbad erwärmt wurde. Bei einer Temperatur zwischen 60 und 80°C beschlug sich das U-Rohr 2, bei 84-89°C sammelte

sich in den Warzen 2 und 3 unter Wasserkühlung eine gelbliche Substanz, die beim Weiterschieben des Ofens in die Warze 1 überdestillierte. In der Kugel blieb ein tiefgelber Rückstand mit vernachlässigbarer Wirksamkeit. Um die Kondensation flüssiger Luft in den substanzhaltigen Zonen zu vermeiden, wurden die U-Rohre beim Abbruch der Destillation aus den Dewars entfernt. Das Rohr wurde zwischen den Substanzzonen verjüngt und mit einer spitzen Gebläseflamme abgeschmolzen. Eingesetzte Menge :  $445 \cdot 10^6$  SE. Wiedergewonnen wurden im U-Rohr 2  $50 \cdot 10^6$  SE, in der Warze 1  $245 \cdot 10^6$  SE, zusammen  $295 \cdot 10^6$  SE  $\hat{=}$  66% Ausbeute.

### 7.3.6 Harnstofftrennung

80 mg Pheromonfraktion 5 B =  $240 \cdot 10^6$  SE wurden zusammen mit 8g zweimal aus  $\text{CH}_3\text{OH}$  umkristallisiertem Harnstoff in 50 ml heißem  $\text{CH}_3\text{OH}$  p. a. gelöst. Beim langsamen Abkühlen der Lösung bildeten sich Harnstoffkristalle, die über ein dünnes Wattefilter von der Mutterlauge abgetrennt und mit wenig eiskaltem  $\text{CH}_3\text{OH}$  nachgewaschen wurden. Die wässrige Lösung dieser Kristalle wurde in einem Schütteltrichter 5 mal mit je 2 ml n-Pentan ausgeschüttelt. Nach dem Eindampfen der Pentanphase an der Drehbandkolonne <sup>114)</sup> blieb ein Rückstand von etwa 30mg = 300 000SE, der vorwiegend aus Paraffinen bestand. Das methanolische Filtrat wurde an der Drehbandkolonne auf kleinstmögliches Volumen eingengt. Es enthielt etwa 50 mg Substanz der Gesamtaktivität  $250 \cdot 10^6$  SE. Ausbeute 104%; Erklärung s. Abschnitt 3.2.3.

### 7.3.7 Hydrierung

Eine Aufschlämmung von 50 mg Hydrierkatalysator (5% Pd/Tierkohle) in Pentan wurde in einer Mikroapparatur vorhydriert. Der  $\text{H}_2$ -Verbrauch erreichte innerhalb 15 min. einen Endwert von 9,6 ml (= 0,43 mMol). Ein Substanzgemisch, dessen Wirksamkeit 47500 SE entsprach, verbrauchte innerhalb 1 Std. 15,0 ml  $\text{H}_2$  (= 0,67 mMol). Wiedergewonnen wurden 45 000 SE = 94%.

### 7.3.8 Verseifung

Eine Lösung von  $1,5 \cdot 10^5$  SE (Substanz Fraktion 6A) in 1 ml  $\text{CH}_3\text{OH}$  wurde mit 10  $\mu\text{l}$  frisch hergestellter konz.  $\text{NaOCH}_3$ -Lösung in  $\text{CH}_3\text{OH}$  vereinigt. 10  $\mu\text{l}$ -Proben dieses Ansatzes wurden nach 30 und 60 min. auf Spurpapier aufgetragen und biologisch getestet. Bei der nach 30 min. entnommenen Probe betrug die Wirksamkeit  $0,3 \cdot 10^5 \text{ SE} \hat{=} 20\%$  der ursprünglichen. Kontrollspuren aus reinem  $\text{NaOCH}_3$  in  $\text{CH}_3\text{OH}$  waren auf Papier unwirksam.

Nach derselben Technik wurden die Verseifungsversuche mit  $\text{HClO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ausgeführt. Kontrollspuren waren abweichend von den Versuchen mit alkalischem Agens wirksam.

## 8.0 ZUSAMMENFASSUNG

1. Es wird ein 6-stufiges Verfahren beschrieben, bestehend aus Ätherextraktion, Wasserdampfdestillation, Pentanextraktion, verlustarmem Entfernen des Lösungsmittelüberschusses, Hochvakuumdestillation und Harnstofftrennung, mit dessen Hilfe ein spurbildendes Pheromon aus lebenden Termiten der Art *Zootermopsis nevadensis* Hagen extrahiert und mit guter Ausbeute um den Faktor 16 000 angereichert wurde.
2. Zum Austesten der biologisch aktiven Fraktionen diente ein biologischer Verhaltenstest, der in Anlehnung an Herrn Professor Lüscher, Bern, ausgearbeitet und verfeinert wurde.
3. Das angereicherte Pheromongemisch war bis  $150^{\circ}\text{C}$  thermisch beständig, gegen alkalische Hydrolyse empfindlich und wurde mit einem wirksamen Anteil von 1 % in das Gitter des kristallisierenden Harnstoffs eingeschlossen.
4. Die biologische Wirkungseinheit ist in Bruchteilen eines Nanogramms enthalten.  
Die höchste spezifische Wirksamkeit mit je  $5 \cdot 10^6$  Spureinheiten pro mg hatten die sehr flüchtige und die weniger flüchtige Fraktion der Hochvakuumdestillation.
5. Weichmachersubstanzen vom Typ der Phthalsäureester störten die Aufarbeitung erheblich, da sie biologisch wirksam sind (etwa 1000 Einheiten pro mg).
6. Für die Pheromonwirkung wesentlich sind die flüchtigen Bestandteile des Extrakts, von denen einige durch gekoppelte Gaschromatographie - Massenspektrometrie näher charakterisiert werden konnten als :
  - 1). ungesättigter Kohlenwasserstoff der Summenformel  $\text{C}_{11}\text{H}_{20}$  vom Molgewicht  $M = 152$ ,
  - 2). aromatischer Ester des Molgewichts  $M = 194$ ,
  - 3). aliphatischer Ester im Bereich um 10 - 12 C-Atome.
 Als wesentlicher Bestandteil der sehr flüchtigen Fraktion wurde n-Caprinsäure erkannt. Sie ist als integrierender Hauptbestandteil der natürlichen Pheromonwirkung anzusehen.

7. Die Pheromonwirkung bei Zootermopsis ist nicht sehr substanz-spezifisch. Terpene wie Citronellol, Geraniol und Farnesol zeigen biologische Wirksamkeit von 2100, 2500 und 50 000 Spureinheiten pro mg.

Biologisch weniger wirksam waren die Bestandteile Squalen und eine sauerstoffhaltige Verbindung vom Molgewicht 238. Unwirksam waren die reinen ungeradzahligen n-Paraffine  $C_{21}H_{44}$ ,  $C_{23}H_{48}$  und  $C_{25}H_{52}$  sowie die verzweigten Paraffine 3-Äthyl-Eicosan, 3-Äthyl-Docosan und 3-Äthyl-Tetracosan. Diese Substanzen spielen aber wahrscheinlich eine biologisch wichtige Rolle beim Fixieren der Duftspur.

Dagegen scheint die Wirkung des körpereigenen Pheromons relativ artspezifisch zu sein. Es wirkt auf die nahe verwandte Art Zootermopsis angusticollis H. etwa 100 mal schwächer.

8. Der spurauslösende Charakter der natürlichen Pheromonbestandteile erscheint an einige Bedingungen 1) chemischer und 2) physikalischer Art geknüpft: Besonders aktiv sind:

- 1) Monocarbonsäuren mit 5 bis 8 C-Atomen, Ester mit aliphatischer Kette von etwa 10 bis 12 C-Atomen, ungesättigte Kohlenwasserstoffe mit 2 C = C-Doppelbindungen, und

- 2) Stoffe eines bestimmten Molgewichtsbereiches von  $M = 100$  bis 250.

9. Orientierende Versuche über den Pheromoncharakter der Voraugendrüsensekrete einiger Gazellen wurden durchgeführt. Aus dem rohen Sekret, das zum größten Teil aus Mucopolysacchariden und Mucoproteinen besteht, wurde eine wasserdampfflüchtige Fraktion mit charakteristischem Geruch abgetrennt.

Als Bestandteile dieser Fraktion wurden die Kohlenwasserstoffe  $C_{17}H_{36}$  und  $C_{20}H_{42}$  identifiziert. Ferner wurden verschiedene weitere Substanzen durch die  $R_f$ -Werte ihrer 2.4-Dinitrophenyl-Hydrazone vorläufig charakterisiert.

10. Biologische Versuche bestätigen die Pheromonnatur des Voraugendrüsensekretes. Das Verhalten der Gazellen ist jedoch nicht charakteristisch genug, um darauf einen biologischen Test aufzubauen.

## 9.0 SCHRIFTENVERZEICHNIS\*

- 1) J. H. FABRE                      Duft und Geruchssinn der Insekten.  
Kosmos III, 146 f. (1906)
- 2) A. BUTENANDT                  Über den Sexual-Lockstoff des Seidenspin-  
u. Mitarb.                      ners Bombyx mori. Reindarstellung und  
Konstitution  
Z. Naturforsch. 14 b, 283 (1959)
- 3) A. BUTENANDT                  Über den Sexuallockstoff des Seidenspin-  
u. Mitarb.                      ners, I. Der biologische Test und die Iso-  
lierung des reinen Sexuallockstoffes Bom-  
bykol  
Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 324, 71  
(1961)
- 4) A. BUTENANDT                  Über den Sexuallockstoff des Seidenspin-  
u. Mitarb.                      ners, II. Konstitution und Konfiguration  
des Bombykols  
Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 324, 84  
(1961)
- 5) P. KARLSON a.                  Pheromones (Ectohormones) in Insects.  
A. BUTENANDT                  Ann. Rev. Ent. 4, 39 (1959)
- 6) P. KARLSON                      Pheromones.  
Ergebn. Biol. 22, 212 (1960)
- 7) P. KARLSON a.                  "Pheromones": a new Term for a Class of  
M. LÜSCHER                      Biologically Active Substances.  
Nature (London) 183, 55, 1835 (1959)
- 8) A. BUTENANDT                  Wirkstoffe des Insektenreiches.  
Naturwissenschaften 46, 468 f. (1959)
- 9) H. S. MICKLEM                  The Proposed Biological Term "Pheromone".  
Nature (London) 183, 1835 (1959)
- 10) J. PAIN                          Sur la phérormone des reines d'Abeilles  
et ses effets physiologiques.  
Ann. Abeilles Fr. 4, 73 (1961)
- 11) C. VERHEIJEN-                  Z. vergleich. Physiol. 41, 527 (1959)  
VOOGD
- 12) D. MATTHES                      Intraspezifische Sekretwirkung bei Insekten.  
Forsch. u. Fortschr. 37, 36 (1963)
- 13) H. MARKL u.                      Physiology of Insect Behavior.  
M. LINDAUER                      in: M. Rockstein, Ed. The Physiology of  
Insecta, Vol. II, p. 92 f.  
Academic Press, New York 1965
- 14) V. J. A. NOVÁK                  Insect Hormones, p. 243 f.  
Methuen u. Co. Ltd., London 1966

- 15) E. O. WILSON      Pheromones  
Sci. Am. 208, 100 (May 1963)
- 16) A. BETHE          Vernachlässigte Hormone.  
Naturwissenschaften 20, 177 (1932)
- 17)        -          Proceedings 2nd Int. Congr. Endocrin.  
London 1964. Part I, Symposium No. 7,  
p. 203 ff. Excerpta Medica Foundation,  
Series No. 83, Amsterdam 1965
- 18) D. SCHNEIDER u.    Zur Elektrophysiologie der Antenne des  
E. HECKER            Seidenspinners *Bombyx mori* bei Reizung  
mit angereicherten Extrakten des Sexual-  
lockstoffes  
Z. Naturforsch. 11 b, 121 (1956)
- 19) B. GÖTZ            Die Sexualduftstoffe an Lepidopteren.  
Experientia (Basel) 7, 406 (1951)
- 20) M. JACOBSON        Insect Sex Attractants, p. 104, 112 f.  
Interscience Publishers, New York 1965
- 21) M. JACOBSON        Isolation, Identification, and Synthesis of  
et al.                the Sex Attractant of Gypsy moth.  
Science (Washington) 132, 1011 (1960)
- 22) A. BUTENANDT      Synthese des Bombykols, des Sexual-Lock-  
u. E. HECKER        stoffes des Seidenspinners, und seiner geo-  
metrischen Isomeren.  
Angew. Chem. 73, 349 (1961)
- 23) E. HODGSON        Chemoreception.  
in: M. Rockstein Ed., The Physiology of  
Insecta, Vol. I, p. 372, 383 f.  
Academic Press, New York 1964
- 24) D. SCHNEIDER      Specificity of Moth Sexual Attractants.  
J. Insect Physiol. 8, 15 (1962)
- E. PRIESNER      persönliche Mitteilung .
- 25) M. LINDAUER u.    Die gegenseitige Verständigung bei den  
W. E. KERR            stachellosen Bienen.  
Z. vergleich. Physiol. 41, 405 (1958)
- 26) A. HAAS            Die Mandibeldrüse als Duftorgan bei eini-  
gen Hymenopteren.  
Naturwissenschaften 39, 484 (1952)
- 27) J. D. CARTHY        The Orientation of two allied species of  
British Ant. II. Odour Trail Laying and  
Following in *Acanthomyops* (*Lasius*)  
*Fuliginosus*.  
Behaviour III, 304 (1951)

- 28) E. O. WILSON      Source and Possible Nature of the Odor-  
Trail of Fire Ants.  
Science (Washington) 129, 643 (1959)
- 29) E. O. WILSON      The social biology of ants.  
Ann. Rev. Entomol. 8, 345 (1963)
- 30) J. C. MOSER a.      Trail Marking Substance of the Texas Leaf-  
M. S. BLUM      Cutting Ant: Source and Potency.  
Science (Washington) 140, 1228 (1963)
- 31) M. S. BLUM a.      The Anatomical Source of Trail Substances  
E. O. WILSON      in Formicine Ants.  
Psyche 71, 28 (1964)
- 32) M. S. BLUM a.      Chemical Releasers of Social Behaviour-V.  
G. N. ROSS      Source, Specificity, and Properties of the  
Odour Trail Pheromone of *Tetramorium*  
*guineense* (F.) (Formicidae: Myrmicinae).  
J. Insect Physiol. 11, 857 (1965)
- 33) W. HANGARTNER      Spezifität und Inaktivierung des Spurphero-  
mons von *Lasius fuliginosus* LATR. und  
Orientierung der Arbeiterinnen im Duftfeld.  
Z. vergleich. Physiol. 57, 103 (1967)
- 34) A. BUTENANDT      Über einen Duftstoff aus der Mandibeldrüse  
u. Mitarb.      der Blattschneiderameise *Atta sexdens*  
*rubropilosa* Forel.  
Arch. Anat. Microscop. Morph. Exp. 48, 13  
(1959)
- 35) C. T. WALSH      Purification of the Fire Ant Trail Substance.  
et al.      Nature (London) 207, 320 (1965)
- 36) E. O. WILSON      Chemical Communication in the Social Insects.  
Science (Washington) 149, 1064 (1965)
- 37) D. J. MCGURK      Volatile Compounds in Ants: Identification  
et al.      of 4-Methyl-3-Heptanone from *Pogono-*  
*myrmex* Ants.  
J. Insect Physiol. 12, 1435 (1966)
- 38) G. W. K. CAVILL a.      Ant Venoms, Attractants, and Repellents.  
P. L. ROBERT-      Science (Washington) 149, 1337 (1965)  
SON
- 39) W. GOETSCH      Vergleichende Biologie der Insektenstaaten.  
Akadem. Verlagsges., Leipzig 1940
- 40) M. LÜSCHER      Sozialwirkstoffe bei Termiten.  
Verhandlg. 11. Internat. Kongr. Entomol.,  
579, Wien 1960

- 41) A. M. STUART      The Structure and Function of the Sternal Gland in *Zootermopsis nevadensis* H. (Isoptera).  
Proc. Zool. Soc. London 143, 43 (1964)
- 42) M. LÜSCHER u.      Ein spurbildendes Sekret bei Termiten.  
B. MÜLLER      Naturwissenschaften 47, 503 (1960)
- 43) G. BECKER u.      Auf Termiten spurbildend wirkende Stoffe.  
H. -J. PETRO-      Naturwissenschaften 54, 16 (1967)  
WITZ
- 44) B. P. MOORE      Isolation of the Scent-trail Pheromone of an Australian Termite.  
Nature (London) 211, 746 (1966)
- 45) T. WATANABE a.      Response of *Reticulitermes flavipes* to  
J. E. CASIDA      Fractions from Fungus-Infected Wood and Synthetic Chemicals.  
J. Econom. Entomol. 56, 300 (1963)
- 46) R. V. SMYTHE      Chemical Studies of Attractants Associated  
et al.      with *Reticulitermes flavipes* and *R. virginicus*.  
J. Econom. Entomol. 60, 228 (1967)
- 47) H. VERRON      Rôle des Stimuli Chimiques dans l'Attraction sociale chez *Calotermes flavicollis* (Fabr.)  
Insectes sociaux, Paris, 10, 297 (1963)
- 48) R. H. WRIGHT      The Science of Smell, p. 148 f.  
George Allen and Unwin Ltd., London 1964
- 49) G. FRAENKEL      Pupation of Flies initiated by a Hormone.  
Nature (London) 133, 834 (1934)
- 50) M. LÜSCHER      (Persönliche Mitteilung)
- 51) P. E. HOWSE      Air Movement and Termite Behaviour  
Nature (London) 210, 967 (1966)
- 52) G. BECKER      Ruheeinstellung nach der Himmelsrichtung, eine Magnetfeldorientierung bei Termiten.  
Naturwissenschaften 50, 455 (1963)
- 53) G. BECKER      Reaktion von Insekten auf Magnetfelder, elektrische Felder und atmosphärische.  
Z. angew. Entomol. 54, 75 (1964)
- 54) L. C. CRAIG      Identification of Small Amounts of Organic Compounds by Distribution Studies.  
J. biol. Chemistry 155, 519 (1944)
- 55) E. HECKER      Verteilungsverfahren im Laboratorium, S. 19.  
Verlag Chemie, Weinheim 1955

- 56) E. STAHL,                   Dünnschichtchromatographie, 2. Aufl.  
Herausg.                   Springer-Verlag, Berlin 1967
- 57) P. KARLSON                The Chemistry of Insect Hormones and  
                                Insect Pheromones.  
Pure and Applied Chemistry 14, 86 (1967)
- 58) R. M. SILVER-           Spectrometric Identification of Organic  
STEIN a.                   Compounds.  
G. C. BASSLER           John Wiley and Sons, Inc., New York 1963
- 59) A. BUTENANDT u.       Über die Isolierung eines Metamorphose-  
P. KARLSON               Hormons der Insekten in kristallisierter  
                                Form.  
Z. Naturforsch. 9b, 389 (1954)
- 60) O. A. BATTISTA        Microcrystalline Cellulose.  
a. P. A. SMITH           Ind. Eng. Chem. 54, 20 (1962)
- 61) M. JACOBSON a.       Masking of the American cockroach sex  
L. A. SMALLS             attractant.  
J. Econ. Entomol. 59, 414 (1966)
- 62) R. KAISER              Chromatographie in der Gasphase, Bd. 1, 124.  
                                Hochschultaschenbücher, Bd. 22/22a  
Bibliographisches Institut, Mannheim 1965
- 63) D. D. NEISWEN-       A New Technique for Collecting Gas Chroma-  
DER                         tograph Eluates.  
J. Gas Chromatog. 4, 426 (1966)
- 64) P. LUFT                Das Gift der Frühjahrslorchel Helvella  
                                (Gyromitra) esculenta Fr. ex Pers., 77.  
Dissertation, Marburg 1967
- 65) R. P. W. SCOTT        Factors that effect the efficient trapping of  
                                GLC column eluent.  
3rd WILKENS Gas Chromatography Symposium,  
Amsterdam, 27.10.1965
- 66) O. L. HOLLIS a.       Water Analysis by Gas Chromatography using  
W. V. HAYES             Porous Polymer Columns.  
J. Gas Chromatog. 4, 235 (1966)
- 67) J. E. LOVELOCK       Electron Absorption Detectors and Technique  
                                for Use in Quantitative and Qualitative Ana-  
lysis by Gas Chromatography.  
Analytic. Chem. 35, 474, 480 (1963)
- 68) J. H. WOLFF           Mikromethoden in der UR-Spektroskopie  
                                Aus der Praxis..., Tips 10 UR (1961),  
Technische Information des Bodenseewerks  
Perkin-Elmer u. Co., GmbH, Überlingen/  
Bodensee.

- 69) E. sz. KOVÁTS      Gas Chromatographic Characterization of Organic Substances in the Retention Index System.  
In: J. C. Giddings a. R. A. Keller, Ed., Advances in Chromatography, Vol. I, p. 229, M. Dekker, Inc., New York 1965
- 70) G. SCHOMBURG      Der Einfluß von Art und Stellung der funktionellen Gruppe in offenkettigen und zyklischen Kohlenwasserstoffen auf das Retentionsverhalten.  
2. Wilkens-Symposium für Gaschromatographie, Darmstadt, 23. 2. 1965
- 71) R. KAISER      Chromatographie in der Gasphase, Bd. III, 79. Hochschultaschenbücher, Bd. 24/24a. Bibliographisches Institut, Mannheim 1965
- 72) L. J. BELLAMY      The Infra-Red Spectra of Complex Molecules, 2nd edition, Methuen, London 1962
- 73) K. BIEMANN      Mass Spectrometry, Applications to Organic Chemistry, p. 170. McGraw-Hill Book Company, New York 1962
- 74) G. SPITELLER      Massenspektrometrische Strukturanalyse organischer Verbindungen, 92. Verlag Chemie GmbH, Weinheim 1966
- 75) H. SCHILDKNECHT      Abwehrstoffe der Arthropoden, ihre Isolierung und Aufklärung. Angew. Chem. 75, 762 (1963)
- 76) P. KARLSON u. P. SCHMIALEK      Notiz über die Isolierung von Malonsäureamid-( $\beta$ -phenyl-äthylamid) aus Garneelen. Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 316, 83 (1959)
- 77) ORGANIKUM      Darstellung von Diazomethan, 3. Aufl., 505. VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1964
- 78) L. F. FIESER u. M. FIESER      Organische Chemie. Deutsche Ausgabe, 149. Verlag Chemie, Weinheim 1965
- 79) G. SCHOMBURG      Combined Use of Gas Chromatography and Spectroscopic Methods. 4th WILKENS Gas Chromatography Symposium, Manchester, 25. 5. 1966
- 80) W. H. McFADDEN      Mass-Spectrometric Analysis of Gas-Chromatographic Eluents.  
In: J. C. Giddings a. R. A. Keller, Ed. Advances in Chromatography, Vol. 4, p. 265. Marcel Dekker, Inc., New York 1967

- 81) R. RYHAGE                      Use of a Mass Spectrometer as a detector and analyzer for effluents emerging from high temperature gas-liquid Chromatography Columns.  
Analytic. Chem. 36, 759 (1964)
- 82) R. RYHAGE a.  
S. WIKSTRÖM                      Applied Mass Spectrometry.  
Science Tools, The LKB Instrument Journal 14, No. 1, April 1967
- 83) M. C. ten NOEVER  
de BRAUW                      Ergebnisse mit einer optimierten Kopplung von Gas-Chromatograph und Massenspektrometer.  
Z. analyt. Chem. 229, 321 (1967)
- 84) R. KAISER                      Die Kopplung der Gaschromatographie mit der Dünnschicht-Chromatographie, der Infrarotspektroskopie, radiochemischen Methoden und dem Kleinmassenspektrometer. *Chimia* 21, 235 (1967)
- 85) F. A. J. M.  
LEEMANS a.  
J. A. Mc  
CLOSKEY                      Combination Gas Chromatography-Mass Spectrometry.  
J. Am. Oil Chem. Soc. 44, 11 (1967)
- 86) D. HENNEBERG                      Combination of Gas Chromatography and Mass Spectrometry.  
4th WILKENS Gas Chromatography Symposium, Manchester, 25. 5. 1966
- 87) J. T. WATSON a.  
K. BIEMANN                      High Resolution Mass Spectra of Compounds Emerging from a Gas Chromatograph.  
Analytic. Chem. 36, 1135 (1964)
- 88) E. BAYER                      Quality and Flavor by Gas Chromatography.  
J. Gas Chromatog. 4, 67 (1966)
- 89) J. ORÓ  
et al.                      GC-MS Analysis of Paraffinic Hydrocarbons in Animal Products.  
J. Gas Chromatog. 3, 105 (1965)
- 90) J. T. HEINS  
et al.                      Direct Food Vapour Analysis and Component Identification by a Coupled Capillary GLC-MS Arrangement.  
J. Gas Chromatog. 4, 395 (1966)
- 91) R. BOCH a.  
D. A. SHEARER                      Identification of Geraniol as the Active Component in the Nassanoff Pheromone of the Honey Bee.  
Nature (London) 194, 704 (1962)

- 92) G. FESTER u. F. BERTUZZI Drüsensekret der Alligatoren (Yacarov). Chem. Ber. 67, 365 (1934)
- 93) D. A. SHEARER a. R. BOCH Citral in the Nassenoff Pheromone of the Honey Bee. J. Insect Physiol. 12, 1513 (1966)
- 94) B. P. MOORE Volatile Terpenes from Nasutitermes Soldiers (Isoptera, Termitidae). J. Insect Physiol. 10, 371 (1964)
- 95) J. H. LAW et al. Biochemical Polymorphism in Ants. Science (Washington) 149, 544 (1965)
- 96) J. MEINWALD et al. Major Components in the Exocrine Secretion of a Male Butterfly (Lycoria) Science (Washington) 151, 583 (1966)
- 97) D. L. WOOD et al. Sex Pheromones of Bark Beetles-I. Mass production, Bio-Assay, Source, and Isolation of the Sex Pheromone of Ips confusus (Le C.). J. Insect Physiol. 12, 523 (1966)
- 98) S. J. LOULOUDIS et al. The hydrocarbons of adult houseflies. Ann. Ent. Soc. Amer. 55, 442 (1962)
- 99) G. W. K. CAVILL a. P. J. WILLIAMS Constituents of Dufour's Gland in Myrmecodia gulosa. J. Insect Physiol. 13, 1097 (1967)
- 100) M. von ARDENNE u. Mitarb. Sterine und Triterpenoide-X. Über die Sterine des Kartoffelkäfers, Leptinotarsa decemlineata Say. J. Insect Physiol. 11, 1365 (1965)
- 101) A. R. GILBY a. M. E. COX The Cuticular Lipids of the Cockroach, Periplaneta americana (L.). J. Insect Physiol. 9, 671 (1963)
- 102) P. G. FAST Insect Lipids: A Review. Memoirs of the Entomological Society of Canada, No. 37, p. 21 f. (1964)
- 103) T. PIECK Synthesis of wax in the Honeybee (Apis mellifera L.). Proc. K. Ned. Akad. Wetenschap. C. 64, 648 (1961)
- 104) J. BOECKH Reaktionsschwelle, Arbeitsbereich und Spezifität eines Geruchsrezeptors auf der Heuschreckenantenne. Z. vergleich. Physiol. 55, 378 (1967)

- 105) D. SCHNEIDER                      Wie arbeitet der Geruchssinn bei Mensch und Tier ?  
Naturw. Rdsch. 20, 319 (1967)
- 106) G. BECKER                        Termitenanlockende Wirkung einiger bei Basidiomyceten-Angriff in Holz entstehender Verbindungen.  
Holzforschg. 18, 168 (1964)
- 107) A. HERFS                         Der Schwarmflug von Reticulitermes lucifugus ROSSI.  
Z. angew. Entomol. 33, 69 (1951)
- 108) A. HERFS                        Schwärmen und Koloniegründung der Termiten.  
In : H. Schmidt, Herausg. : "Die Termiten", 121.  
Akademische Verlagsgesellschaft Geest und Portig KG., Leipzig 1955
- 109) K. GÖSSWALD                    Die Gelbhalstermit (Calotermes flavicollis FABR.) als Versuchstier.  
In : H. Schmidt, Herausg. : "Die Termiten", 165.
- 110) R. KAISER                        Chromatographie in der Gasphase, 1. Teil, S. 50.  
Hochschultaschenbücher, Bd. 22/22 a.  
Bibliographisches Institut, Mannheim 1965
- 111) A. M. STUART                    Alarm, Defense, and Construction Behavior Relationships in Termites (Isoptera).  
Science (Washington) 156, 1123 (1967)
- 112) R. KAISER                        Chromatographie in der Gasphase, 1. Teil, S. 124.  
Hochschultaschenbücher, Bd. 22/22 a.  
Bibliographisches Institut, Mannheim 1965
- 113) H. SCHÜBEL                      Zur Strukturaufklärung der Abwehrstoffe der Trinervitermes-Soldaten, S. 58  
Dissertation, Erlangen-Nürnberg 1963
- 114) A. L. GLASEBROOK  
      and F. E. WILLIAMS              Distillation, in : A. Weissberger, ed. :  
Technique of organic chemistry, Vol. IV,  
p. 230, Interscience Publishers, Inc., New York 1951

- 115) G. BECKER                      Über Haltung von Termiten im Laboratorium  
Z. angew. Zool. 52, 385 (1965)
- 116) F. R. WALTHER                Einige Verhaltensbeobachtungen an Thomson-  
gazellen (*Gazella Thomsoni* Günther, 1884)  
im Ngorongoro-Krater  
Z. Tierpsychol. 21, 871 (1964)
- 117) F. R. WALTHER                Verhaltensstudien an der Grantgazelle  
(*Gazella granti* Brooke, 1872) im Ngorongoro-  
Krater  
Z. Tierpsychol. 22, 167 (1965)
- 118) H. HEDIGER                   Säugetier-Territorien und ihre Markierung  
Bijdr. tot de Dierkde. 28, 171 (1949)

---

\* Frl. R. Kunze danke ich für ihre Hilfe beim Beschaffen schwerer  
zugänglicher Literatur.

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Leitung von Herrn Professor Dr. P. KARLSON im Institut für Physiologische Chemie der Philipps-Universität Marburg in der Zeit von September 1964 bis September 1967.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. P. KARLSON, der mich zu dieser Untersuchung anregte, danke ich für die großzügige Förderung, die er dieser Arbeit zuteil werden ließ.

Herrn Professor Dr. M. LÜSCHER, Bern, danke ich für wertvolle Termitenrohextrakte.

Besonderen Dank schulde ich meinen Kollegen Herrn Dr. D. ADELUNG und Herrn Dr. G. WEIRICH für kritische Diskussionen und zahlreiche nützliche Hinweise.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Professor Dr. F. ZILLIKEN und seinen Mitarbeitern für wertvolle Unterstützung, den Firmen Farbwerke HOECHST AG (Frankfurt/Main-Hoechst) und HAARMANN-REIMER GmbH (Holzminden) für Vergleichssubstanzen sowie vielen Diskussionspartnern aus Nah und Fern, die mich in methodischer Hinsicht beraten haben.

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft und der Schweizerische Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung unterstützten die Beschaffung der Termitenrohextrakte durch Sachbeihilfen.

## LEBENS LAUF

Am 30. 4. 1939 als 1. Sohn der Eheleute Walter Hummel und Julie Hummel, geb. Mössner, in Heilbronn-Böckingen geboren, besuchte ich dort vom September 1945 bis September 1949 die Grundschule, wurde anschließend Schüler des altsprachlichen Zweigs des humanistischen Theodor-Heuss-Gymnasiums Heilbronn und legte dort am 19. Februar 1958 die Reifeprüfung ab. Im Sommersemester 1958 begann ich als Werkstudent an der Technischen Hochschule Stuttgart mit dem Chemiestudium. Meine Nebenfächer waren Physik, Mineralogie und Maschinenkunde. Das Diplomchemiker-Vorexamen bestand ich am 27. Oktober 1960 in Stuttgart und wechselte im April 1961 die Hochschule, um mein Studium im Sommersemester an der Ludwig-Maximilian-Universität München fortzuführen. Die Diplomchemiker-Hauptprüfung legte ich dort am 30. Mai 1963 ab und begann im Juli 1963 unter der Leitung von Professor Dr. P. Karlson am Physiologisch-Chemischen Institut München mit meiner Diplomarbeit zum Thema: "Vergleichende Modelluntersuchungen zur Struktur des Insektenhormons Ecdyson".

Da mein Lehrer im April 1964 einem Ruf auf den ordentlichen Lehrstuhl für Physiologische Chemie an der Philipps-Universität Marburg folgte, schloß ich diese Diplomarbeit erst nach dem Umzug nach Marburg am 29. 7. 1964 ab. Anschließend begann ich im September 1964 am selben Institut mit den Versuchen zur vorliegenden Dissertation. Seit November 1964 bin ich mit der Verwaltung einer wissenschaftlichen Assistentenstelle beauftragt. Mein Hauptinteresse galt chromatographischen und spektroskopischen Analysenverfahren sowie dem Unterricht in physiologischer Chemie.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren: Bredereck, Gompper, Förster, Goubeau, Seel, Kneser, Hiller und Quack (in Stuttgart), Wiberg, Fischer, Huisgen, Schwab, Lynen, Karlson, Butenandt und Bücher (in München) und Karlson, Starke, Lüttke und Hensel (in Marburg).



